

Aus der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Pneumologie

Direktor: Prof. Dr. med. C. Vogelmeier

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum

Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

**Analyse von Polymorphismen
wichtiger Entzündungsmediatoren
bei Patienten mit COPD und Bronchialkarzinomen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

vorgelegt dem
Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

Alexandra Plagens

aus

Brackenheim

Marburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
am: 13.03.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan:	Prof. Dr. med. Matthias Rothmund
Referent:	Priv.-Doz. Dr. med. Carola Seifart
Korreferent:	Prof. Dr. med. Harald Renz

INHALT

Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung	3
1 Einleitung	5
1.1 Die Krankheitsbilder COPD und Bronchialkarzinom	5
1.1.1 COPD	5
1.1.2 Bronchialkarzinom	8
1.2 Warum Entzündung?	9
1.3 Warum Genetik?	11
1.4 Fragestellung	13
2 Stand der Forschung - wissenschaftlicher Hintergrund	15
2.1 aktueller Stand der genetischen Forschung	15
2.2 Kopplungsstudien	17
2.3 Kandidatengene	20
2.3.1 Genpolymorphismen	22
3 Material und Methoden	26
3.1 Darstellung der Patienten- und Kontrollkollektive	26
3.1.1 Patientenkollektive	26
3.1.1.1 COPD-Patienten	26
3.1.1.2 Bronchialkarzinompatienten	29
3.1.1.2.1 NSCLC-Gruppe	29
3.1.1.2.2 SCLC-Gruppe	29
3.1.1.2.3 Rauchverhalten der BC-Gruppen	30
3.1.2 Kontrollgruppen	32
3.1.2.1 Populationskontrollgruppe	32
3.1.2.2 gematchte Kontrollgruppen	32
3.1.2.2.1 gematchte Kontrollgruppe COPD	33
3.1.2.2.2 gematchte Kontrollgruppe BC	33

3.2	Technische und laborchemisch Methoden	34
3.2.1	Blutgewinnung	34
3.2.3	DNA-Isolation aus EDTA Blut	34
3.2.2.2	Detektion von Nucleinsäuren durch Gel-Elektrophorese	36
3.2.2.2.1	DNA-Detektion durch horizontale Agarose-Gel-Elektrophorese	37
3.2.4	PCR-Polymerasekettenreaktion	38
3.2.4.1	Grundlagen	38
3.2.4.2	Analyse der Polymorphismen mittels RFLP basierter (converted) cPCR	39
3.2.4.3	Amplifikation des DNA-Fragments mittels converted PCR (cPCR)	40
3.2.3.3.1	Detektion der Restriktionsfragmente durch vertikale Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	44
3.3.	Statistische Verfahren	48
4	Ergebnisse	52
4.2	COPD Ergebnisse	52
4.1.1	Statistische Auswertung COPD	55
4.2	Bronchialkarzinom Ergebnisse	56
4.2.1	Statistische Auswertung Bronchialkarzinome	63
4.3.	Statistische Auswertung Kontrollgruppen	64
5	Diskussion	66
5.1	Methodischer Ansatz	67
5.2	COPD	70
5.3	Bronchialkarzinome	75
5.4	Schlußfolgerung	78
6	Literaturverzeichnis	80
Anhang		

ZUSAMMENFASSUNG

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) und das Bronchialkarzinom (BC) sind weltweit häufige Erkrankungen von großer volkswirtschaftlicher Bedeutung, deren Inzidenz auch in Zukunft noch weiter ansteigen wird. Es handelt es sich hierbei um zwei unterschiedliche Lungenerkrankungen, zum einen die COPD, als chronisch progrediente Erkrankung mit einer irreversiblen Atemwegs-/Bronchialobstruktion und/oder einem Lungenemphysem und zum andern das Bronchialkarzinom, eine maligne Erkrankung der Lunge. Bei derzeit fehlenden kurativen Therapiemöglichkeiten für die COPD und der weiterhin schlechten Prognose der Bronchialkarzinome scheinen Untersuchungen zur weiteren Klärung ätiopathogenetischer Mechanismen dieser beiden Erkrankungen sinnvoll. Für beide Entitäten stellt das Zigarettenrauchen einen gemeinsamen und entscheidenden Risikofaktor dar. Zudem ist die wichtigste pathogenetische Komponente der COPD, die Atemwegsobstruktion, ein unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung eines Bronchialkarzinoms. Beide Faktoren, die Bronchialobstruktion und das Zigarettenrauchen sind für die pathogenetische Endstrecke beider Erkrankungen entscheidend. Starker Zigarettenkonsum führt jedoch nicht immer zu einer Atemwegsobstruktion, einer COPD oder einem Bronchialkarzinom. Diese Tatsache legt nahe, dass bezüglich der Frage der Krankheitsentwicklung eine interindividuelle Empfindlichkeit eine Rolle spielt. Diese Empfindlichkeit wird entscheidend auch durch den individuellen genetischen Hintergrund geprägt. Zur näheren Analyse von möglicherweise beteiligten Faktoren können sogenannte Kandidatengene untersucht werden. Dabei handelt es sich um Gene, deren Genprodukte bei der Krankheitsentstehung eine mutmaßliche oder gesicherte Rolle spielen.

Für die COPD und/oder die Bronchialkarzinome sind zum Beispiel das Ausmaß der Entzündungsantwort, die antioxidative Kapazität, die Aktivität metabolisierender Enzyme und mögliche zelluläre Abwehrmechanismen gegen exogene toxische oder kanzerogene Noxen von

Bedeutung. Deshalb stellen die Gene wichtiger Entzündungsmediatoren eben solche Kandidatengene und Genpolymorphismen eine Möglichkeit einer veränderten individuellen Empfindlichkeit dar.

In der vorgelegten Arbeit werden Polymorphismen der Gene der Entzündungsmediatoren Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- α) und -beta (TNF- β), Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin 10 (IL-10) bei Patienten mit COPD und Bronchialkarzinomen im Vergleich mit Kontrollgruppen in einer Fall-Kontroll Studie untersucht.

Bei der Analyse der TNF- α und TNF- β , sowie der IL-6 Polymorphismen zeigten sich keine relevanten Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen und der COPD bzw. der Bronchialkarzinomgruppe.

Bei Patienten mit einer COPD und bei einer biologischen Untergruppe der Bronchialkarzinome, den kleinzelligen Karzinomen (SCLC), fand sich eine signifikant höhere Frequenz des IL-10 -1082_G Polymorphismus. Hierbei handelt es sich um einen funktionellen Polymorphismus, der in vivo mit einer verstärkten IL-10 Produktion assoziiert ist. IL-10 selbst ist als antiinflammatorisches Zytokin ein wichtiger Bestandteil der Entzündungsmediation. Eine genetisch determinierte alterierte Entzündungsreaktion könnte für die Entwicklung chronischer Entzündungsvorgänge bei beiden Entitäten biologisch eine wichtige Rolle spielen und so die Suszeptibilität für deren Entwicklung beeinflussen.

Die aufgezeigte Korrelation des Polymorphismus des IL-10 Gens mit der Entwicklung einer COPD oder eines Bronchialkarzinoms, weist auf einen Zusammenhang von immunologischen und antiinflammatorischen Prozessen in den Atemwegen und der Pathogenese von COPD und Bronchialkarzinomen hin. Ebenso könnte der assoziierte Einzelbasenaustausch (SNP) auch zur Risikostratifikation, oder möglicherweise zur serologischen Typisierung im klinischen Bereich dienen.

1 EINLEITUNG

1.1 Die Krankheitsbilder COPD und Bronchialkarzinom

Bei der COPD und auch beim Bronchialkarzinom handelt es sich um Erkrankungen, die bei globaler Betrachtung schon heute in der Rangliste der häufigsten Erkrankungen einen Platz unter den ersten zehn einnehmen und deren Bedeutung bezüglich Inzidenz, Morbidität und Mortalität weiter zunehmen wird. Somit haben diese Erkrankungen auch eine relevante sozioökonomische Bedeutung.

1.1.1 COPD

Die COPD trägt einen großen Anteil an der weltweiten Morbidität und Mortalität und hat im Jahre 1990 44 Millionen Menschen betroffen. In den Industrienationen ist die COPD heute schon die viert häufigste Todesursache und wird bis zum Jahre 2020 vermutlich an dritter Stelle stehen. Zudem spielt die COPD eine zunehmende Rolle bei Frauen in den westlichen Industrienationen und scheint in Ländern wie Indien, Mexico, Kuba, Ägypten, Südafrika und China einen explosionsartigen Anstieg zu verzeichnen (*Peto et al. 1999*).

Im Jahre 2000 wurde die GOLD Initiative (Global Initiative on Chronic Obstructive Lung Disease) gegründet, die eine international einheitlich akzeptierte Definition des Krankheitsbildes vorgelegt hat. Dementsprechend ist die COPD durch eine progressive, nicht vollständig reversible Atemflusslimitation, mit oder ohne Verlust elastischer Rückstellkräfte und oder Lungenparenchym gekennzeichnet, die durch den Prozess einer abnormen chronischen Entzündung im Zusammenhang mit Zigarettenrauchen oder anderen inhalativen Schadstoffen bedingt ist.

Nach den Guidelines der British Thoracic Society ist sie definiert als eine über einen Zeitraum von einigen Monaten persistierende irreversible Atemwegsobstruktion (*BTS 1997*). Hierbei handelt es sich um ein

Syndrom bestehend aus den Faktoren einer chronischen Bronchitis, einer Bronchiolitis (Erkrankung der kleinen Atemwege) und eines Lungenemphysems, die im Ausprägungsgrad der einzelnen Komponenten individuell variieren kann.

Die COPD ist durch eine chronische Entzündungsreaktion der Atemwege und durch einen Verlust von Lungenfunktion (FEV_1) gekennzeichnet. Bei gesunden Nichtrauchern gibt es eine physiologische Abnahme des FEV_1 von 25-30 ml/Jahr ab dem 35. Lebensjahr (*Tager et al. 1988*). Dieser physiologische Prozess wird bei einer bestimmten Gruppe von Rauchern, sogenannten „rapid declinern“ um ein vielfaches verstärkt (*Sandford AJ 2001; Joos L 2002; Lokke A 2005*). Anhand des klinischen Parameters der postbronchodilatatorisch gemessenen forcierten expiratorischen Einsekundenkapazität (FEV_1) wird die COPD nach internationaler Übereinkunft (GOLD) in die folgenden 4 Schweregrade eingeteilt (s. auch Übersicht 1): Schweregrad I (leichtgradig): $FEV_1/VC < 70\%$ $FEV_1 \geq 80\%$ Soll; Schweregrad II (mittelgradig): $FEV_1/VC < 70\%$, 50% Soll $< FEV_1 < 80\%$ Soll; Schweregrad III (schwer): $FEV_1/VC < 70\%$, 30% Soll $< FEV_1 < 50\%$ Soll; Schweregrad IV (sehr schwer): $FEV_1/VC < 70\%$, $FEV_1 < 30\%$ Soll oder $FEV_1 < 50\%$ Soll mit chronisch respiratorischer Insuffizienz (*Pauwels RA 2001*).

Übersicht 1: Schweregradeinteilung der COPD:

<u>Schweregrad</u>	<u>Kriterien</u>
I (leicht)	$FEV_1 \geq 80\%$ Soll, $FEV_1/VC < 70\%$ mit/ohne Symptomatik (Husten, Auswurf)
II (mittel)	50% Soll $< FEV_1 < 80\%$ Soll, $FEV_1/VC < 70\%$ mit / ohne chronischen Symptomen (Husten, Auswurf, Dyspnoe)
III (schwer)	30% Soll $< FEV_1 < 50\%$ Soll, $FEV_1/VC < 70\%$ mit / ohne chronischen Symptomen (Husten, Auswurf, Dyspnoe)
IV (sehr schwer)	$FEV_1 < 30\%$ Soll, $FEV_1/VC < 70\%$ oder $FEV_1 < 50\%$ Soll plus chronische respiratorische Insuffizienz

Der wichtigste Risikofaktor, der zur Entwicklung einer COPD führen kann ist zweifellos Zigarettenrauchen, wobei das Alter zum Beginn, die Anzahl der pack years (py) und das aktuelle Rauchverhalten eine Rolle für die COPD-Mortalität spielen (*Higgins MW und Thom T 1989; Sherrill DL et al. 1990*). Auch Geschlecht, Rasse und der sozioökonomische Status beeinflussen die Mortalitätsraten der COPD. Bei Weißen (Kaukasiern) ist die Mortalität höher als bei Nicht-Weißen (*Higgins MW und Thom T 1989 in Hensley MJ und Saunders SA (Hrg.), Anto JM et al. 2001*). Die Prävalenzrate ist für Männer höher als für Frauen (*Sherrill DL et al. 1990*).

Die pathophysiologischen Mechanismen der COPD, die zu einer Verengung der kleinen Atemwege führen, ist als Resultat chronischer Entzündungsreaktionen anzusehen, die durch aktivierte T-Lymphozyten und Makrophagen gekennzeichnet sind. Ebenso spielen fibrotische Veränderungen eine Rolle. Hinweise für eine neutrophile Entzündungsreaktion ergeben sich durch den Nachweis einer erhöhten Anzahl von Neutrophilen in der bronchoalveolären Lavage (*Thompson PB 1989*). Desweiteren zeigt sich in induziertem Sputum von COPD Patienten ein charakteristisch erhöhter Anteil aktivierter neutrophiler Leukozyten, der im Vergleich zu Rauchern ohne Bronchialobstruktion deutlich höher ist (*Keatings VM 1996 und 1997*).

1.1.2 Bronchialkarzinome

Bronchialkarzinome sind maligne Entartungen der Lunge. Hierbei handelt es sich unter den soliden Tumoren um die Krebsart mit der aktuell höchsten Mortalität. Innerhalb aller Tumorerkrankungen nehmen die Bronchialkarzinome inzwischen den dritten Rang ein, geschlechtsspezifisch handelt es sich um den zweithäufigsten Tumor beider Geschlechter (*Jemal A 2004 und 2005*) mit einer sehr niedrigen 5-Jahres Überlebensrate (*Fry WA 1999*). In den letzten 50 Jahren ist die Inzidenz des Bronchialkarzinoms um 249% und die Mortalität um 259% gestiegen. Zwar steigen die Zahlen bei den Männern nicht mehr an, aber es erkranken inzwischen zunehmend Frauen an dieser Tumorerkrankung (*Alberg AJ 2005*).

Die Bronchialkarzinome werden histologisch in zwei Untergruppen eingeteilt: die kleinzelligen Bronchialkarzinome (SCLC = small cell lung carcinoma) und die nicht kleinzelligen Bronchialkarzinome (NSCLC = non small cell lung carcinoma). Die zuletzt genannte Gruppe der NSCLC wird aufgrund unterschiedlicher Histologien in entsprechende Subgruppen unterteilt. Das Plattenepithelkarzinom (PE), das Adenokarzinom (AC) und das großzellige Karzinom stellen hier die wichtigsten und häufigsten Formen dar. Risikofaktor für die Entstehung von Bronchialkarzinomen ist unabhängig vom histologischen Typ das Zigarettenrauchen. Für die Adenokarzinome sei bemerkt, dass sie auch ohne Einfluss von Zigarettenrauch entstehen können.

Weitere vom Zigarettenrauchen unabhängige Risikofaktoren für die Entstehung von Bronchialkarzinomen sind neben seltenen berufsbedingten exogenen Noxen, z.B. beim Schiffsbau, im Tagebau und in Raffinerien, das Vorhandensein einer Atemwegsobstruktion und die COPD (*Skillrud DM 1986, Samet JM 1986, Mayne ST 1999, Papi A 2004, Tockman MS 1987; Islam SS 1994*).

1.2 Warum Entzündung?

Chronische Entzündungsvorgänge in den Atemwegen sind sowohl für die COPD als auch für das Bronchialkarzinom als ein wichtiger ätiopathogenetischer Faktor anzusehen. Bekanntermaßen spielen proinflammatorische Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine, Interleukine und Tumor Nekrose Faktor- α und - β für die Auslösung und Aufrechterhaltung solcher Entzündungsprozesse eine bedeutende Rolle.

Die Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion und somit die Chronifizierung wäre durch einen im Folgenden postulierten Circulus vitiosus erklärbar, an dessen Beginn ein Ungleichgewicht von Oxidantien und Antioxidantien stünde. Hierdurch käme es zu einer von immunologischen Zellen (Makrophagen und Monozyten) ausgehenden proinflammatorischen Stimulation durch TNF- α u.a. und somit zu einer Erhöhung des „Respiratory Burst“, der wiederum zu einer Erhöhung der Oxidantien und dadurch zu einer Verstärkung des oxidativ / antioxidativen Ungleichgewichts und zur Aufrechterhaltung der proinflammatorischen Stimulation führen könnte.

Patienten, die an einer COPD erkrankt sind stellen eine eigene Risikogruppe für die Entwicklung eines Bronchialkarzinoms dar (*Skillrud DM 1986 s.o.; Petty TL 1997*) und auch eine chronische Entzündung kann zu Lungenkrebs führen (*Malkinson AM 2000*). Chronische Entzündungsvorgänge können, durch Änderung der Aktivität des Erbmaterials (Onkogene, Protoonkogene) bzw. Mutationen, zur Entwicklung von Dysplasien oder Metaplasien führen, aus denen, wie beispielsweise beim Zervixkarzinom oder bei gastrointestinalen Tumoren, eine maligne Entartung resultieren kann. Die parallele Untersuchung einer chronisch entzündlichen Erkrankung eines Organs und der einer malignen Tumorerkrankung des gleichen Organs kann Hinweise auf mögliche pathophysiologische Zusammenhänge ergeben. Dies gilt im Besonderen für die COPD und das Bronchialkarzinom.

Da die Frage der Chronifizierung eines Entzündungsprozesses, wie oben als möglicher Ablauf pathogenetischer Mechanismen dargestellt, nicht zuletzt von Entzündungsmediatoren und deren Wirksamkeit abhängt, stellen die Gene solch wichtiger Entzündungsmediatoren für beide Erkrankungen relevante Kandidatengene dar.

In den Atemwegen sind Tumor Nekrose Faktor- α , Tumor Nekrose Faktor- β , Interleukin 6 und Interleukin 10 wichtige Modulatoren von Entzündungsprozessen. Für die Gene dieser Modulatoren sind jeweils zwei oder mehr Polymorphismen bekannt. Für einige dieser Polymorphismen von TNF, IL-6 und IL-10 wurde nachgewiesen, dass sie mit einem erhöhten Proteinspiegel oder erhöhten Transkriptionsraten einhergehen, dass es sich hierbei also um funktionelle Polymorphismen handelt (*Fishman D et al. 1998; Messer G et al. 1991; Turner DM et al. 1997; Wilson AG et al. 1997; Eskdale J et al. 1998*). Somit könnten also genetisch determinierte Expressionsunterschiede von Entzündungsmediatoren das Risiko einer chronischen Inflammation und dadurch auch die Suszeptibilität beider Erkrankungen beeinflussen.

1.3 Warum Genetik?

Beide Erkrankungen sind Beispiele für komplexe multifaktorielle Krankheiten, für die es außer umweltbedingten noch eine Vielzahl von Faktoren gibt, die zur Krankheitsentstehung beitragen, am ehesten in Form eines diffizilen Zusammenspiels mit endogenen Faktoren, zu denen auch die genetische Disposition zählt.

Für beide Gruppen gilt, dass Zigarettenrauchen der wichtigste exogene Risikofaktor ist (*Burch PR 1980; Carbone D 1992; Doll R und Peto R 1994*).

Zwischen dem Verlust von Lungenfunktion und Zigarettenrauchen ist ein Zusammenhang inzwischen gesichert, aber auch hier ist das Rauchverhalten nur für etwa 15% der Lungenfunktionsvariabilität verantwortlich zu machen (*Beck GJ et al. 1981*). Das Krebsrisiko für ein Bronchialkarzinom ist bei Rauchern mindestens 10mal höher, als bei Nichtrauchern (*Doll R und Peto R 1981*), jedoch erkranken auch hier entsprechend der COPD bei weitem nicht alle Raucher an einem Bronchialkarzinom (*Amos CI et al. 1999*). Deshalb müssen neben dem Zigarettenrauchen noch andere, das Erkrankungsrisiko modulierende Faktoren, wie individuelle pathophysiologische Eigenschaften eine bedeutende Rolle spielen. Hierbei kommt neben Umweltfaktoren, stattgehabten Virusinfektionen in der Kindheit und der Exposition von Luftschadstoffen, im wesentlichen der individuelle genetische Hintergrund in Betracht, der in Kombination bzw. Interaktion mit Umweltfaktoren den Ausschlag gibt, ob es zur Entstehung eines Bronchialkarzinoms kommt bzw. in wie weit und in welcher Ausprägung eine COPD entsteht.

Für die Bronchialkarzinome könnte die Tatsache, dass „nur“ ein geringer Teil der Raucher erkrankt auch mit der allgemein begrenzten Lebenserwartung in Zusammenhang gebracht werden, sodass beispielsweise, entsprechend der vielen als okkulte Tumore post mortem diagnostizierten Prostatakarzinome, bei genauerer Unter-

suchung bei nahezu jedem Raucher bei einer Obduktion histologische Zeichen einer COPD bzw. der Karzinomentwicklung zu finden wären.

Schon seit den 1970er Jahren gibt es epidemiologische Daten dafür, dass die Suszeptibilität für COPD und Lungenkrebs durch den genetischen Hintergrund modifiziert wird (*COPD: Cohen BH 1977, Tockman MS 1987; BC: Samet JM 1986, Alberg AJ 2005*). Für beide Erkrankungen ist eine familiäre Häufung bekannt, und eine Atemwegsobstruktion, der wichtigste pathogenetische Faktor der COPD, gilt als unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung eines Bronchialkarzinoms (*Skillrud DM 1986, Samet JM 1986, Mayne ST 1999, Papi A 2004, Tockman MS 1987; Islam SS 1994*).

Das führt zu der Überlegung, dass es genetische Faktoren geben muss, die das Risiko der Personen, die Zigarettenrauch inhalieren und / oder kanzerogenen Stoffen ausgesetzt sind, modifizieren. Bei der genetischen Interaktion scheint das individuelle Erkrankungsrisiko durch lokale Faktoren in den Atemwegen und die individuellen Antwortreaktionen auf die umweltbedingten Noxen beeinflusst zu werden.

Somit scheinen genetische Faktoren wichtige Ansatzpunkte für die Klärung der bisher noch weitgehend unklaren Krankheitsentstehung dieser beiden Erkrankungen darzustellen.

1.4 Fragestellung

Die chronisch obstruktive Atemwegserkrankung und das Bronchialkarzinom sind multifaktorielle Erkrankungen, mit infektiologischen, genetischen und exogenen Risikofaktoren. Als den wesentlichen exogenen Risikofaktor teilen sie das Zigarettenrauchen. Doch nur ein Teil der Zigarettenraucher entwickelt eine COPD oder ein Bronchialkarzinom. Ein Umstand, der zum aller größten Teil durch die Bedeutung des individuellen genetischen Hintergrundes zu erklären ist. Im Besonderen spielt dabei die genetisch bedingte Variabilität der Reaktion auf Zigarettenrauch und damit assoziierten Karzinogenen eine wichtige Rolle (*Alberg AJ et al. 2005; Alberg A und Samet JM 2003*). Der genetische Hintergrund von Rauchern für die Entwicklung einer Atemwegsobstruktion, einer COPD oder eines Bronchialkarzinoms hat vermutlich eine gemeinsame Basis, da die pathophysiologisch wichtigste Komponente der COPD, die Atemwegsobstruktion, unabhängig vom Rauchverhalten ein relevanter Faktor für die Entwicklung eines Bronchialkarzinoms ist (*Cohen BH et al. 1977, Tockman MS et al. 1987, Islam SS et al. 1994*)

Entscheidend für die Entwicklung einer COPD ist die Frage, ob und in welchem Ausmaß exogene Noxen einen chronischen Entzündungsprozess initiieren können, denn die Chronifizierung einer Entzündungsreaktion in den Atemwegen ist ein entscheidender Faktor in der Pathogenese der COPD und geht zudem mit einem deutlich erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Bronchialkarzinoms einher (*Petty TL 1997, Askling J et al. 1999, Malkinson AM et al. 2000*).

Bezüglich der Initiierung von Entzündungsprozessen und der Chronifizierung spielt zum einen die Frage der primären Abwehr schädigender Substanzen, aber auch die Umsetzung einer durch Kontakt mit solchen Noxen resultierenden zellulären (Entzündungs-) Reaktion eine Rolle. Entzündungsvorgänge spielen dabei nicht nur rein zellbiologisch eine Rolle, auch begünstigen rezidivierende Atemwegs-

infektionen die Entwicklung einer COPD, sodass der primären und der erworbenen Infektabwehr eine besondere Bedeutung zukommt. Auch für die Entwicklung eines Bronchialkarzinoms ist die primäre Abwehr exogener Noxen und deren Metabolisierung entscheidend, ebenso wie die Umsetzung und Modulation von Entzündungsreizen. Daher sind für beide Erkrankungen solche Gene besonders wichtig, deren Genprodukte Entzündungsvorgänge initiieren, modulieren oder hemmen.

In der Gruppe der Entzündungsmediatoren finden sich alle Genprodukte, die für die Initiation, die Modulation und Eindämmung von Inflammationsreaktionen eine Rolle spielen. Dazu gehören typischerweise die klassischen Entzündungsmediatoren, wie Tumor Nekrose Faktor α und β , die Interleukine und Interferone. Von diesen konnten bisher einige wenige Gene (IL-1, TNF, IL-13) in bestimmten Populationen mit dem Auftreten einer COPD assoziiert werden. (Zheng *T et al.* 2000)

Interleukin-6 und Interleukin-10 wurden bisher bei Patienten mit COPD nicht untersucht. Bezüglich der Entwicklung eines Bronchialkarzinoms fehlen bisher Untersuchungen für nahezu alle Entzündungsmediatoren.

Die im folgenden dargestellte Arbeit untersucht in einer Fall-Kontroll Studie bei Patienten mit COPD oder Bronchialkarzinomen Gene der Entzündungsmediatoren TNF- α und TNF- β , Interleukin-6 und Interleukin-10, die Schlüsselrollen in der Entzündungsmediation einnehmen.

2 STAND DER FORSCHUNG - WISSENSCHAFTLICHER HINTERGRUND

2.1 Aktueller Stand der genetischen Forschung

Sowohl die COPD, als auch das Bronchialkarzinom sind keine monokausalen Erkrankungen. Sie entstehen nach heutigem Wissen durch ein Zusammenspiel vieler Faktoren und gehören somit zu den sogenannten komplexen Erkrankungen. Für diese Erkrankungen besteht eine ebensolche Interaktion zwischen dem individuellen genetischen Hintergrund und Umwelteinflüssen.

Komplexe Erkrankungen basieren auf einer sogenannten multifaktoriellen Genese mit polygenem Hintergrund. Die Vorstellung für den Prozess der Krankheitsentstehung ist, dass es hierbei zu einem Zusammentreffen von mehreren Genvariationen bzw. -mutationen kommt, die unter Einwirkung von exogenen Faktoren zur Entwicklung des Phänotyps führen. Deshalb ist hier ein sehr heterogener genetischer Hintergrund zu erwarten, der sich von Population zu Population unterscheiden kann. Ebenfalls erschwerend kommt häufig hinzu, dass die Phänotypdefinition oftmals kompliziert ist. Die Erkrankung tritt in vielen unterschiedlichen Ausprägungen auf und kann nicht exakt anhand eines Messparameters bestimmt werden.

Unter dem Krankheitsbegriff der COPD werden verschiedene Krankheitsbilder subsumiert, die teilweise eine ähnliche oder identische klinische Endstrecke haben.

Beim Bronchialkarzinom ist die Definition des Phänotyps aufgrund der Histologie einfacher, die Pathogenese jedoch keineswegs monokausal und auch das Bronchialkarzinom, wie alle anderen Krebserkrankungen, muss zu den komplexen Erkrankungen gerechnet werden. Diese Komplexität zeigt sich beim Blick auf die Pathophysiologie der Karzinomentstehung. Hierbei handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, der durch verschiedene genetische und epigenetische Veränderungen gekennzeichnet ist. Dazu gehören unter anderem Keimbahn-

mutationen in Tumorsuppressorgenen, molekulargenetische Veränderungen im Tumorgewebe und von Zigarettenrauch abhängige Mutationen der Onkogene der RAS-Familie und p53 Mutationen.

Die Identifikation von genetischen Markern kann, neben der Möglichkeit der Einschätzung des individuellen Risikos und einer damit verbundenen gezielten Prävention, auch Hinweise für mögliche, pathogenetische Zusammenhänge geben. Genetische Marker können durch unterschiedliche Methoden identifiziert und bezüglich ihre Signifikanz untersucht werden.

Um den genetischen Hintergrund einer Erkrankung näher zu analysieren, stehen verschiedene Untersuchungsmethoden zur Verfügung. Als Basismethoden sind hier Familien- bzw. Zwillingsstudien und Segregations- (Stammbaum-) analysen zu nennen.

Familien- bzw. Zwillingsstudien untersuchen die Frage, ob und in welchem Maß genetische Faktoren bei der untersuchten Erkrankung eine Rolle spielen. Durch Segregationsanalysen wird die Art des Erbgangs, ob ein dominanter oder rezessiver Vererbungsmodus vorliegt, und ob es sich um eine mono- bzw. polygen bedingte Erkrankung handelt, bestimmt. Als weiterführende Untersuchungsmethoden dienen zur Identifizierung von relevanten Genen Linkageanalysen bzw. Kopplungsstudien und Kandidatengenanalysen.

Die familiäre Häufung für das Auftreten der COPD konnte in mehreren Studien gezeigt werden (*Larson RK et al. 1970; Tager IB et al. 1976; Lebowitz MD et al. 1984; Tager I et al. 1978; Redline S et al. 1989; Higgins und Keller 1975; Madison R et al. 1980; Kueppers F et al. 1977; Kurzius-Spencer et al. 2001; Kauffmann F et al. 1989; Devor EJ et al. 1984; Hubert HB et al. 1982; Redline S et al. 1987; Rybicki et al. 1990; Astemborski et al. 1985; Givelber et al. 1998 und Chen Y et al. 1996*). Allerdings ist der einzige bisher nachgewiesene genetische Risikofaktor für die Entwicklungen einer COPD in Form eines schweren Lungenemphysems der Alpha-1 Antitrypsinmangel (*Needham M und Stockley RA 2004*).

2.2 Kopplungsstudien

Durch Kopplungsstudien können Genorte identifiziert werden, die im Zusammenhang mit der Erkrankung stehen, sie suchen innerhalb mehrfach betroffener Familien nach einer gemeinsamen chromosomalen Lokalisation. Man untersucht, ob in diesen Familien bestimmte Haplotypen bzw. kurze Genomsequenzen gemeinsam mit dem Phänotyp weitervererbt werden.

Durch Linkageanalysen bzw. Kopplungsstudien können nach Detektion relevanter Genregionen auch Gene entdeckt werden, die bisher noch nicht bekannt sind oder noch nicht im Zusammenhang mit der Pathogenese der fokussierten Erkrankung gesehen wurden.

Das Ergebnis dieser Studien zeigt eine Wahrscheinlichkeit an, mit der ein bestimmter Genort an ein phänotypisches Merkmal gekoppelt ist. Mit diesen Studien kann das gesamte Genom analysiert werden. Das Ergebnis ist aber von einer exakten Definition des Phänotyps und dem gleichzeitigen Auftreten bei den betroffenen Familien abhängig. Bei der COPD wurden solche Studien zur Identifizierung von Suszeptibilitätsgenen durchgeführt. Als phänotypische Merkmale eignen sich hier die Lungenfunktionsparameter als standardisierte Größen.

Bisher ist noch nicht klar in wie weit und durch welche Parameter der Verlust von Lungenfunktion, der bei der COPD ein wesentliches klinisches Merkmal darstellt, determiniert ist. Für diese Fragestellung wurden mehrere genomweite Kopplungsuntersuchungen durchgeführt (*Wilk JB et al. 2003; Joost O et al. 2002; Silverman EK et al. 2002a und 2002b; DeMeo DL et al. 2004*) (s. Übersicht 2).

In der Family Heart Study des National Heart, Lung and Blood Institute (*Wilk JB et al. 2003 Rev.*), der Boston Early-onset Studie (*Silverman EK et al. 2002*) und der Netherland Asthma Study (*Postma et al. 2005*) zeigen sich relevante Regionen mit einer Kopplung für FeV_1/FVC auf Chromosom 4 und 2q, für FeV_1 auf Chromosom 12p. Auf der Basis der in diesen Studien identifizierten Loci wurden Assoziationsstudien

durchgeführt und erfolgreich COPD relevante Gene identifiziert (*Celedon JC et al. 2004, Hegab AE et al. 2004*).

Hierzu gehören die auf Chromosom 12 und 19 liegenden Gene der mikrosomalen GST1 und TGF- β , ebenso wie IL-8 und SERPINE2 auf Chromosom 2q. Inzwischen konnten für SERPINE2 8 SNPs mit signifikanter Assoziation für eine COPD gezeigt werden (*DeMeo DL et al. 2004*).

Für das Bronchialkarzinom wurde eine genomweite Kopplungsstudie durchgeführt (*Bailey-Wilson JE et al. 2004*), die für ein zugrundegelegtes autosomal dominantes Modell eine Kopplung auf Chromosom 6q23-25 zeigte. Allerdings wurden hier zusätzliche Tumorentitäten, nämlich Hals- und Larynxkarzinome mit eingeschlossen, so dass dieser Befund möglicherweise nur eingeschränkt gilt. Der Kopplungsbereich umfasst interessanterweise eine Region, die für Deletionen oder chromosomale Imbalancen bei sporadischen Bronchialkarzinomen (NSCLC) bekannt ist (*Berrieman HK et al. 2004; Goeze A et al. 2002; Petersen I et al. 1997; Luk C et al. 2001*).

Übersicht 2: Linkageanalysen/ Kopplungsstudien

Population:	Genort:	Kriterium	LOD
<u>Framingham Heart Study (Joost 2002)</u>			
gesunde Individuen	Chromosom 6:	FeV ₁	2.4
1578 Mitglieder	Chromosom 21:	FVC	2.6
aus 330 Familien,			
<u>NHLBI: Family Heart Study (Wilk 2003)</u>			
gesunde Individuen,	Chromosom 4:	FeV ₁ /FVC	3.5
2178 Mitglieder	Chromosom 18:	FeV ₁	2.5
aus 391 Familien	Chromosom 18	FVC	2.9
<u>Boston Early-onset Study (Silverman 2002)</u>			
COPD-Patienten	Chromosom 2q	FeV ₁ /FVC	4.13
und Verwandte,	Chromosom 12p:	FeV ₁	3.26*
585 Mitglieder	Chromosom 19q	chron. Bronch.	3.3*
aus 72 Familien	Chromosom 12p:	Atemwegsobstruktion	3.14*
<u>Netherland Asthma Study (Postma 2005)</u>			
Asthma-Patienten	Chromosom 2q:	prä-/	4.9*/
und Verwandte		postbronchodil.	6.03*
aus 200 Familien		FeV ₁ /FVC	

*: nur Raucher

Eine LOD > 3 bezeichnet eine signifikante Evidenz für eine Kopplung, eine LOD < 3 bezeichnet eine vermutliche Evidenz

2.3 Kandidatengene

Kandidatengene sind Gene, deren Genprodukte bei der Pathogenese von Erkrankungen eine bekannte oder postulierte Rolle spielen.

Eine solche Kandidatengenanalyse ist aber einerseits dadurch eingeschränkt, dass nur schon bekannte Gene untersucht werden können und dass, um Indexpatienten und Kontrollen zu matchen, eine exakten Phänotypdefinition vorliegen sollte. Andererseits spielen bei einer multifaktoriellen Genese, außer den genetischen auch umweltbedingte Faktoren eine Rolle, die durch eine komplexe Interaktion zusammenspielen.

Die Methode der Kandidatengenanalyse ist zwar relativ direkt, einfach und schnell durchführbar, die Ergebnisse sind aber oft schwierig zu interpretieren oder in anderen Populationen zu reproduzieren.

Kandidatengenanalysen vergleichen die Frequenz/Häufigkeit von Genvariationen oder Polymorphismen in Gruppen mit einer zu untersuchenden Erkrankung und Kontrollgruppen. Kandidatengenanalysen führen allerdings oft zu widersprüchlichen Ergebnissen. Diese unterschiedlichen Ergebnisse von Fall- Kontroll- bzw. Assoziationsstudien sind wahrscheinlich auf die Unterschiede zwischen der Studienpopulation, der Phänotypdefinition und der relativ kleinen Größe der betrachteten Population zurückzuführen. Zusätzlich scheint das Fehlen der Berechnung von Stratifikationsunterschieden zwischen Fällen und Kontrollen innerhalb einer Studie und das Fehlen der adäquaten Korrektur für den Vergleich von multiplen Polymorphismen mit multiplen Phänotypen ebenfalls ein Problem darzustellen. Trotzdem lassen sich aus den Daten der bisher durchgeführten Assoziationsstudien Schlussfolgerungen ziehen, die in weiteren Untersuchungen zu neuen Erkenntnissen geführt haben und möglicherweise weiter führen werden.

Für die COPD spielen als Quelle für Kandidatengene die Bereiche der Proteolyse/Antiproteolyse, der Oxidation/Antioxidation, der Inflam-

mation/Antiinflammation, der Entgiftung von Zigarettenrauch und der mukoziliären Clearance eine Rolle. Analysen aus diesen Bereichen weisen auf verschiedene Assoziationen hin. Hier sind im Folgenden einige Beispiele für Kandidatengene dargestellt.

Die erste genetische Assoziationsstudie aus den 1970er Jahren untersuchte die zu diesem Zeitpunkt bekannte geringe Anzahl bekannter genetischer Polymorphismen: hierbei handelt es sich zum großen Teil um Blutgruppenantigene (*Cohen BH et al. 1977*). Anschließend wurden Kandidatengene, von denen man einen Einfluss auf die Pathophysiologie der COPD erwartete, untersucht. Zum Beispiel wurden Polymorphismen von Genen von Proteinen, die die Lunge gegenüber proteolytischer Aktivität schützen bestimmt. In dieser Gruppe findet sich der bis heute einzig gesicherte genetische Defekt der zur Entwicklung eines Emphysems führt, der angeborene α 1-Antitrypsin (AAT) Mangel, der allerdings nur für weniger als 1% aller COPD-Erkrankungen verantwortlich ist (*Falk et al. 1970 a, Falk et al. 1970 b, Tobin et al. 1983, Black et al. 1978, Janus et al. 1985, Brantly et al. 1988, Shigeoka et al. 1976, Bartmann et al. 1985, Barnett et al. 1875, Alvarez-Granda et al. 1997, Sandford et al. 2001 c, Silva et al. 2003, Seersholm et al. 2004, Kueppers et al. 1977*). Das Risiko ein Lungenemphysem zu entwickeln ist bei homozygoten Trägern massiv erhöht, insbesondere wenn es sich um Raucher handelt. Ob heterozygote Träger auch ein real erhöhtes Risiko haben ist umstritten.

Ein Faktor, der beim Zigarettenrauchen eine wichtige Rolle spielt sind die freien Radikale, die in einer Größenordnung von 10^7 pro Zug an einer Zigarette eine Lungenschädigung verursachen können. Auf diese Weise können Defekte bei der Entgiftung dieser reaktiven Substanzen bei Rauchern zur Entwicklung einer Bronchialobstruktion und eines Emphysems und somit zu einer COPD führen.

Im System der Oxidantien und Antioxidantien spielen z.B. die mikrosomale Epoxid Hydrolase (*Yoshikawa M et al. 2000; Park JY et al. 2005*), die Häm-Oxygenase (*Yamada N et al. 2000*) und auch die

Glutathion-S1-Transferasen (*Ishii T et al. 1999*) , für die Assoziationen zur COPD gezeigt werden konnten, eine wichtige Rolle. (*Sandford AJ, AJRCCM 2000, Yoshikawa M et al. 2000; Park JY et al. 2005; Yamada N et al. 2000; Ishii T et al. 1999*).

Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α), ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin bei Entzündungsvorgängen, das vor allem in Monozyten und Makrophagen produziert wird, bewirkt zum einen über die Induktion von IL-8 und die Aktivierung von NF- κ B einen Neutrophilen-Stimulus und die Expression inflammatorischer Gene, wie zum Beispiel IL-2 und IL-5 und zum anderen über die Induktion der Synthese von Zelladhäsionsmolekülen (*Pober JS et al. 1986*) die Fixation mobiler Entzündungszellen, was zur Persistenz und möglichen Chronifizierung der Entzündungsreaktion beiträgt (*Übersicht bei: Mukhopadhyay S, Hoidal JR und Mukherjee TK 2006, Review; Jäätela M 1991 und Keatings VM et al. 1996*).

In der bronchoalveolären Lavage (BAL) von Patienten mit COPD wurden erhöhte TNF- α Spiegel gemessen (*Low RB et al. 1978; Keatings VM et al. 1997; Ariaz-Diaz J et al 1994*). Zudem konnte für verschiedene maligne Tumorerkrankungen (Lymphome und Mammakarzinome) eine erhöhte Frequenz des TNF- α -308_A Allels nachgewiesen werden (*Warzocha K et al. 1998; Gaudet MM et al. 2007*).

2.3.1 Genpolymorphismen

Bei Polymorphismen handelt es sich um Veränderungen des genetischen Materials in Form von Variationen der Basensequenzen als Einzelbasebaustausch oder Tandem- etc. Repeat. Solche Variationen der Basensequenzen treten mehr oder weniger häufig in der Bevölkerung auf. Je nach Lokalisation dieser Variation kann es sich um funktionelle oder nichtfunktionelle Polymorphismen handeln.

Funktionelle Polymorphismen beeinflussen durch Veränderung von Genprodukt und/oder der Aktivität der Genexpression den Phänotyp, wie das am Beispiel des AAT- Mangels zu sehen ist.

Das TNF- α Gen befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 in direkter Nähe zu den immunologisch bedeutenden Genen der MHC-Komplexe. Für TNF- α gibt es mehrere Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs). Einer dieser Polymorphismen an Position -308 der Promoter-region besteht in einem Austausch von Guanin nach Adenin. Dieser Promoter-Polymorphismus weist ein höherfrequentes Allel TNF- α -308_G (Guanin) und ein selteneres Allel TNF- α -308_A (Adenin) auf. Für das G-Allel wurde eine höhere Induktionsrate des endogenen TNF- α *in vitro* gezeigt (Wilson AG et al. 1997). Somit handelt es sich um einen funktionellen Polymorphismus, für den eine Assoziation mit chronischer Bronchitis in einem taiwanesischen (Huang S-J et al. 1997) und einem japanischen (Sakao S et al. 2001) Kollektiv nachgewiesen werden konnte. In einem irischen Kollektiv (Keatings VM et al. 2000) konnte eine Assoziation mit einer schlechten Prognose der COPD und schnellem Lungenfunktionsverlust gezeigt werden. Diese Befunde konnten jedoch in mehreren Studien mit entsprechenden und divergierenden Populationen nicht bestätigt werden (Sandford AJ et al. 2001; Hegab AE et al. 2005; Ishi T et al. 2000, Jiang L et al. 2005; Keatings et al. 2000; Higham MA et al. 2000; Ferrarotti I et al. 2003). Möglicherweise ist dieser Polymorphismus nur in asiatischen Sub-/Populationen für die Entwicklung einer COPD von Bedeutung.

Interleukin 6 und 10 wurden bisher bei Patienten mit COPD nicht untersucht.

Für die Bronchialkarzinome spielen im Rahmen der Karzinogenese unterschiedliche Mechanismen der Alteration des Erbmaterials eine wichtige Rolle. Hierzu gehört der Kontakt mit einem Karzinogen, die Karzinogen Aktivierung und Inaktivierung oder Verstoffwechselung, die

Bildung von DNA-Addukten und -Brüchen, DNA-Reparatur, Genmutationen, Gen-Methylierung zum Ausschalten eines Gens, Histon-Acetylierung, eine darauf folgende genomische Instabilität, der Verlust der Proliferationskontrolle und der Apoptose-Sensibilität, die Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren und die Angiogenese-Induktion. Bei diesem Zusammenspiel steht ganz am Anfang die Wechselwirkung von schädigendem Agens und dem betroffenen Organismus. Deshalb konzentrieren sich die meisten der bisher durchgeführten Kandidatengenanalysen auf solche Gene, deren Genprodukte an der Biotransformation von im Zigarettenrauch enthaltenen Schadstoffen und Karzinogenen beteiligt sind bzw. die durch Zigarettenrauch induzierbare Karzinogene aktivieren oder deaktivieren können und Gene deren Genprodukte Entzündungsvorgänge beeinflussen.

Für einige Kandidatengene gibt es konsistent positive Assoziationsbefunde, teilweise auch in unterschiedlichen Populationen, beispielsweise für die Myeloperoxidase (*Schabath 2000*), Enzyme der Cytochrom p450-Familie (*Bartsch 2000*), der Glutathion-S-Transferase (*Harrison et al. 1997*), der mikrosomalen Epoxidhydrolase (*Gsur et al. 2003*), den Matrix Metalloproteinasen (*Zhu et al. 2001*), sowie DNA-Reparaturgene (*Chen et al. 2002, Zhou et al. 2003*).

Der TNF- β Intron1 Polymorphismus wurde bei Bronchialkarzinomen bezüglich der postoperativen Überlebensrate mit einem längeren Überleben assoziiert und scheint für diese Entität mit einer Resistenz gegenüber der Karzinomentwicklung und einer besseren Prognose assoziiert zu sein. (*Shimura T 1994*).

Weitere Ergebnisse zeigen die in vivo Produktion von inflammatorischen Zytokinen und einer gesteigerten tumorassoziierten NO-Produktion, wie durch erhöhte Konzentrationen von Nitrit/Nitrat in der BAL schon zu vermuten war.

Neue tierexperimentelle Untersuchungen bezüglich der Rolle der Entzündung bei der Tumorgenese konnten nachweisen, dass einige Loci für die Entwicklung von Lungentumoren mit denen für Entzündungsprozesse homolog sind (*Bauer AK et al. 2004*), einschließlich dem für TNF- α , der schon zuvor als ein für Lungentumore relevanter Locus postuliert wurde (*Sueoka N et al. 2001*). Assoziationsstudien für TNF- α , IL-6 und IL-10 bei Bronchialkarzinomen liegen bisher nicht vor.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Darstellung der Patienten- und Kontrollkollektive

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Studie untersucht ein Kollektiv von insgesamt 591 kaukasischen Individuen bestehend aus Patienten mit COPD, Bronchialkarzinomen und Kontrollen.

3.1.1 Patientenkollektive

Das Patientenkollektiv wurde auf der Grundlage der Genehmigung des Ethik-Antrages der Studie „Genetische Prädispositionsfaktoren bei chronischen Lungenerkrankungen„ (Studie 16/98) aus Patienten des Zentrums für Innere Medizin (ZIM) der Philipps – Universität Marburg im Zeitraum von 1998 bis 2002 rekrutiert.

Die Rekrutierung des Kollektivs der Bronchialkarzinompatienten erfolgte im Zeitraum Januar 1998 bis März 1999 im Zentrum für Innere Medizin (ZIM), SP Hämatologie/Onkologie. Patienten mit schweren pulmonalen Begleiterkrankungen wie COPD II-III°, Pneumonie, Lungenfibrose oder anderen interstitiellen Lungenerkrankungen wurden ausgeschlossen.

3.1.1.1 COPD Patienten (Übersicht s. Tabelle 3-1)

In die Gruppe der COPD Patienten wurden nach Aufklärung, Aushändigung des Informationsblattes und Erteilung des Einverständnisses, solche Patienten eingeschlossen, bei denen aufgrund der Anamnese und Lungenfunktionsdiagnostik eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung festgestellt wurde oder bekannt war. Entsprechend der Anamnesekriterien Husten, Auswurf und Luftnot, sowie des Lungenfunktionsparameters FeV_1 wurde nach den 1998 geltenden international anerkannten Kriterien der WHO für die chronische Bronchitis und der Schweregradeinteilung entsprechend der

ATS (American Thoracic Society)-/ERS (European Respiratory Society)-Kriterien die Einteilung in eine leichte (I°), mittelschwere (II°) und schwere (III°) Obstruktion anhand des FeV_1 -Wertes getroffen: $FeV_1 < 70\%$, $< 50\%$, $< 35\%$.

Anhand der Eigenanamnese wurden andere Lungenerkrankungen, wie z. B. eine Sarkoidose, Tuberkulose, Asthma oder Pneumonie als mögliche Ursache der Obstruktion ausgeschlossen. Einen weiteren wesentlichen Punkt der vegetativen Anamnese bildete das Rauchverhalten, das zum einen allgemein in Nicht- bzw. Nie-, Ex- und aktive Raucher und zum anderen quantitativ entsprechend der Anzahl gerauchter Päckchen Zigaretten/Tag/Jahr (pack years, py) eingeteilt wurde. Die Rauchgewohnheiten wurden in Übereinstimmung mit einer Europäischen Multicenter-Studie, die bei Rauchern mit einer Rate von je 10 py ein signifikant erhöhtes Risiko von 70% für die Entwicklung bzw. das Vorliegen einer COPD zeigen konnte (*Sherrill D et al. 1990*) mit einem cut-off von 10 py (1 py entspricht dem Rauchen 1 Packung Zigaretten/Tag über einen Zeitraum von 1 Jahr) in Nichtraucher und Raucher klassifiziert. Demnach wurden Nichtraucher und ehemalige Raucher mit weniger als 10 py als Nichtraucher und ehemalige Raucher und Raucher mit mehr als 10 py als Raucher klassifiziert.

Die zu untersuchende Gruppe der COPD Patienten besteht aus 113 Patienten, davon sind 90 Männer und 23 Frauen mit einer COPD. Die Einschlusskriterien waren eine positive Anamnese hinsichtlich der Anamnese Kriterien der chronischen Bronchitis entsprechend der WHO-Definition: Husten und Auswurf über einen Zeitraum von mindestens 3 Monaten in zwei aufeinanderfolgenden Jahren, die nicht durch andere Ursachen pulmonaler oder kardialer Genese erklärt sind (*Siafakas NM, ERJ 1995*) und die Lungenfunktionsparameter.

Alle Patienten wiesen eine positive Anamnese für chronischen Husten und Auswurf und/oder Dyspnoe bei leichter, schwerer Belastung oder in Ruhe auf.

Im Anschluss an die körperliche Untersuchung erfolgte die Messung der Lungenfunktionsparameter mittels Spirometrie. In Übereinstimmung mit den internationalen Diagnosekriterien haben wir die folgenden Kriterien zur Diagnosestellung der COPD angewendet: Forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde (FEV_1) < 70%, das Verhältnis von FEV_1 zu forcierter Vitalkapazität (FEV_1/FVC) < 80% und den expiratorischen Spitzenfluss (PEF) < 70%. Es wurden ausschließlich Patienten in die COPD-Gruppe eingeschlossen, die wenigstens 2 dieser diagnostischen Kriterien erfüllten. Entsprechend den internationalen Standards wurde das beste von 3 durchgeführten Manövern (mit dem Gerät Masterlab 4.0 der FA E.Jäger, Deutschland) ausgewertet. Die COPD-Gruppe wurde in unterschiedliche Schweregrade eingeteilt, bestimmt durch das FEV_1 (Siafakas NM, ERJ 1995) entsprechend der zum Zeitpunkt des Beginns dieser Untersuchung gültigen ERS/ATS-Kriterien.

Tabelle 3-1: Gruppencharakteristika der COPD-Gruppe

	Anzahl der Individuen	Durchschnittsalter (Jahre)	Geschlechtsquotient (männlich/weiblich)	% Raucher (>10 py)	durchschnittl. FEV_1 (Ist vom Soll)
Population	131	33.3	0.98	40.5%	
gematchte Kontrollen	113	67.5	3.9	83.1%	
COPD	113	67.5	3.9	83.1%	41.2%
-- COPD I°	47	66.5	3.2	85.1%	62.7%
-- COPD II°	42	69.7	3.2	80.9%	43.8%
-- COPD III°	24	69.7	11.0	83.3%	29.6%

* COPD: Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (chronischer Bronchitis). I°, II°, III°, zeigt den zunehmenden Schweregrad basierend auf dem FEV_1 . COPD I°: $FEV_1 > 50\%$; II: $FEV_1 = 35-49\%$; III°: $FEV_1 < 35\%$.

Von 113 Patienten gehörten 47 (41,5%) in die COPD-Gruppe I° ($FEV_1 > 50\%$), 42 (37,1%) in die Gruppe COPD II° ($FEV_1 = 35-49\%$) und 24 (21,2%) in die Gruppe III° ($FEV_1 < 35\%$). In der COPD-Gruppe wurden 94 Patienten als Raucher (≥ 10 py) klassifiziert. Ausschlusskriterien waren die Anamnese eines allergischen Asthma bronchiale, Atopie, Pneumonie, Tuberkulose und Mukoviszidose.

3.1.1.2 *Bronchialkarzinompatienten (Übersicht s. Tabelle 3-2)*

3.1.1.2.1 *NSCLC-Gruppe*

Von den 77 Patienten der NSCLC-Gruppe hatten 40 ein Plattenepithel-, 26 ein Adeno-, 5 ein großzelliges Karzinom und 6 eine andere als die o.g. Histologie. Die Gruppe besteht aus 69 männlichen und 8 weiblichen Patienten (Geschlechterverhältnis männlich/weiblich: 8,6), mit einem Durchschnittsalter von 65,4 (42-82) Jahren. Von den 77 Patienten waren 68 (88,3%) Raucher mit mehr als 10 py, 10 weniger als 20 py, 25 zwischen 21-40 py, 17 (14,5%) zwischen 41-60 py und 10 (12,9%) mehr als 60 py. Die durchschnittliche py-Zahl lag bei 36,5 für alle NSCLC-Patienten zusammen, 43,9 bei den Plattenepithelkarzinomen und 23,5 bei den Adenokarzinomen.

3.1.1.2.2 *SCLC-Gruppe*

Die SCLC-Gruppe besteht aus 40 Patienten, 35 Männern und 5 Frauen (Geschlechterverteilung m/w: 7,0). Das Alter der Patienten lag zwischen 44-84 Jahren mit einem durchschnittlichen Alter von 63,3 Jahren. 39 Patienten (97,5%) wurden als ehemalige bzw. aktive Raucher klassifiziert. 2 Patienten rauchten weniger als 20 py, 15 (37,5%) zwischen 21-40, 13 (32,5%) zwischen 41-60 und 6 (15%) mehr als 60 py (s. Tabelle 3-2 und 3-3). Die durchschnittliche Menge der gerauchten Zigaretten lag bei 43,8 py.

3.1.1.2.3 Rauchverhalten der BC Gruppen (s. Tabelle 3-3):

Die Anzahl der Raucher ergab in der Populationskontrollgruppe 40.5%, 88.3% in der NSCLC-Gruppe und 97.5% in der SCLC-Gruppe. Die höchste Anzahl der py mit 43.8 wurde in der Gruppe der SCLC-Patienten dokumentiert, die niedrigste mit 23.5 py in der Gruppe der Adenokarzinom-Patienten. Individuen mit mehr als 60 py waren in der Gruppe der SCLC-Patienten deutlich über- und in der Gruppe der Adenokarzinom-Patienten deutlich unterrepräsentiert (s. Tabelle 3-2 + 3-3). Die Gruppenmerkmale der einzelnen Untergruppen sind in Tabelle 3-2 und 3-3 dargestellt.

Die Blutproben für die Genotypanalyse wurden entsprechend den Richtlinien und nach Stattgabe der Ethikkommission (Studie 16/98) abgenommen, nachdem das Einverständnis der Patienten im Anschluss an eine ausführliche Aufklärung erteilt wurde. Es wurden Blutproben in Form von 1 x 5-10 ml EDTA-Blut pro Person gesammelt.

Tabelle 3-2: Gruppencharakteristika der Bronchialkarzinom-Gruppen

	Kontrollgruppe			Bronchialkarzinom Gruppe			
	Population (n=131)	Gematchte Kontrollen		NSCLC (n=77)	SCLC (n=40)	PE (n=40)	AC (n=26)
		gematchte NSCLC (n=77)	gematchte SCLC (n=40)				
<i>männlich/ weiblich</i>	0.98	8.7	14.5	8.7	14.5	10.7	10.5
<i>Alter (Spanne) [Jahre]</i>	33.3 (25-62)	65.4 (42-82)	63.3 (44-84)	65.4 (42-82)	63.3 (44-84)	65.4 (34-82)	65.6 (42-81)
<i>Nicht- /Gelegenheits- raucher [n(%)]</i>	78 (59.5%)	9 (11.7%)	1 (2.5%)	9 (11.7%)	1 (2.5%)	2 (5.0%)	6 (23.1%)
<i>Ex-/Raucher [n(%)]</i>	53 (40.5%)	68 (88.%)	39 (97.5%)	68 (88.%)	39 (97.5%)	9 (95.5%)	20 (76.9%)

Tabelle 3-3: Anzahl der pack years (py) in der Gruppe der Ex- und Raucher

	NSCLC (%)	SCLC (%)	PE (%)	AC (%)
<i>11-20 py</i>	10 (12.9)	2 (5.0)	2 (5.0)	6 (23.0)
<i>21-40 py</i>	25 (32.4)	15 (37.5)	14 (35.0)	6 (23.0)
<i>41-60 py</i>	17 (14.5)	13 (32.5)	13 (32.5)	5 (19.2)
<i>>60 py</i>	10 (12.9)	6 (15.0)	5 (12.5)	1 (3.8)
<i>Unavailable</i>	4 (3.4)	2 (5.0)	3 (7.5)	1 (3.8)
durchschnittliche py	36.5	43.8	43.9	23.5

zu Tabelle 3-2 und 3-3:

NSCLC = nichtkleinzellige Bronchialkarzinome, SCLC = kleinzellige Bronchialkarzinome, PE = Plattenepithelkarzinome, AC = Adenokarzinome

3.1.2 Kontrollgruppen

Als Kontrollkollektiv wurden aus einer Anzahl von 600 Patienten, die im Zentrum für Innere Medizin (ZIM) eine Lungenfunktionsdiagnostik erhalten haben, diejenigen ohne Lungenerkrankung, mit normaler Lungenfunktion, gematcht nach Alter, Geschlecht und Rauchgewohnheiten der Bronchialkarzinom-gruppe in eine gematchte Kontrollgruppe eingeschlossen.

Wir bildeten zwei Kontrollgruppen. Die erste Kontrollgruppe, als Populationskontrollgruppe bezeichnet, besteht aus zufällig eingeschlossenen gesunden Personen, der Populationskontrolle. In die zweite, sogenannte gematchte Kontrollgruppe wurden in 1:1 Übereinstimmung der Faktoren Alter, Geschlecht, Rauchverhalten und dem Ausschlusskriterium Lungenerkrankung Patienten aus dem ZIM der Philipps-Universität Marburg eingeschlossen. Die Charakteristika dieser Gruppen sind in Tabelle 3-1 und 3-2 dargestellt. Die Personen wurden

in Raucher und ehemalige, sogenannte Ex-Raucher eingeteilt, wenn sie eine Rauchanamnese von mindestens 10 pack years (py) aufwiesen.

3.1.2.1 Populations-Kontrollgruppe

Um eine vergleichbare Baseline der Polymorphismus-Frequenzen in einer kaukasischen Gruppe von deutschen Individuen zu bestimmen haben wir eine Populationskontrollgruppe zusammengestellt.

Die Populationskontrollgruppe besteht aus 131 eingeschlossenen gesunden Individuen. Sie wurden im Rahmen einer arbeitsmedizinischen Vorsorgeuntersuchung an der Universität Marburg bei Neueinstellung oder Stellenwechsel im Zeitraum von Oktober 1998 bis Juli 1999 körperlich untersucht. Wir schlossen dabei 131 Personen ein, 66 Männer und 65 Frauen, mit einem Durchschnittsalter von 33,3 Jahren bei einer Verteilung von 25-62 Jahren. 53 (40,5%) davon waren Raucher oder wiesen eine Rauchanamnese von mindestens 10 py auf.

3.1.2.2 gematchte Kontrollgruppe

Aus einer Gesamtzahl von 600 Individuen aus dem Zentrum Innere Medizin wurden mit 113 bzw. 117 davon, Paare mit Übereinstimmung von Alter, Geschlecht und Rauchgewohnheiten gebildet. Mittels Spirometrie und Ganzkörperplethysmographie wurden die Lungenfunktionsparameter ermittelt und dokumentiert. Die Blutproben der Patienten wurden im Zeitraum von Januar 1998 und Januar 2000 gesammelt. Eingeschlossen wurden ausschließlich Patienten mit normaler Lungenfunktion und ohne Anamnese von Symptomen oder einer manifesten Lungenerkrankung.

3.1.2.2.1 *gematchte Kontrollgruppe COPD*

Die Mehrzahl, 102 Patienten (90,3%) litt an einer KHK ohne klinische Zeichen einer Herzinsuffizienz, 4 Patienten (3,5%) an einer schlafbezogenen Atmungsstörungen, 4 Patienten (3,5%) unterzogen sich einer Krebsoperation und 3 Patienten (2,7%) litten an anderen Erkrankungen, wie zum Beispiel an Diabetes mellitus. Entsprechend der COPD-Gruppe, wurden 90 Männer und 23 Frauen mit einem Durchschnittsalter von 67.5 Jahren und einer Altersspanne von 31-84 Jahren eingeschlossen. 94 Patienten (83,1%) davon waren aktive Raucher oder wiesen eine Rauchanamnese mit mehr als 10 py auf.

3.1.2.2.2 *gematchte Kontrollgruppe BC*

Für jeden Bronchialkarzinompatienten wurde eine gematchte Kontrolle (bezogen auf Alter, Geschlecht und Rauchanamnese) eingeschlossen. Einschlusskriterien waren das Fehlen einer pulmonalen Erkrankung, eine normale Lungenfunktion und eine Anamnese ohne Symptome einer Lungenerkrankung. Die Rauchgewohnheiten wurden entsprechend der obigen Beschreibung mit einem cut-off von 10 py eingeteilt. Von den insgesamt 117 Kontrollpatienten waren 100 (85.4%) KHK-Patienten, 4 (3.4%) Patienten hatten eine schlafbezogene Atmungsstörung, 3 (2.5%) unterzogen sich einer Tumoroperation (kein Bronchialkarzinom) und 10 (8.5%) litten an anderen Erkrankungen.

3.2 Technische und laborchemische Methoden

Die verwendeten Geräte, Materialien , Reagenzien und Chemikalien mit Hersteller – und Bezugsqueklle sind im Anhang aufgelistet

3.2.1 Blutgewinnung

Die Gewinnung des Patienten-/Probandenblutes erfolgte durch standardisierte intravenöse Blutabnahme mittels Kanüle und Monovettensystem. Es wurde ein Volumen von 5- 10 ml Blut in eine handelsübliche EDTA-Monovette abgenommen. EDTA (Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure) dient der Verhinderung der Koagulation und somit der Erhaltung und Verwertbarkeit der Leukozyten zur DNA - Isolation. Die Aufbewahrung des EDTA-Blutes geschah bis zur DNA-Isolation bei + 4°C, danach bei - 20 / - 80°C.

3.2.2 Isolation menschlicher genomischer DNA aus EDTA-Blut

MATERIALIEN

Die Isolation der DNA erfolgte aus dem EDTA-Blut mittels eines QIAamp Blood Mini Kit der Fa. QIAGEN, der die folgenden Reagenzien und Materialien enthielt :

- Protease
- Buffer AL (Lysis-Puffer)
- Buffer AW 1 (1.Wasch-Puffer)
- Buffer AW 2 (2.Wasch-Puffer)
- Buffer AE (Elution-Puffer) : 10 mM Tris Cl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0
- Spin columns: Filter-Membran für Vakuum-/Zentrifugeneinsatz

Zusätzlich benötigte Materialien:

- Ethanol 96-100%
- Eppendorf Cups

- Zentrifuge
- Heizblock

TECHNISCHER ABLAUF DER DNA-ISOLATION

Die Isolation der Leukozyten DNA aus EDTA – Blut erfolgte in den im Folgenden dargestellten 4 Arbeitsschritten.

LYSE: 300µl EDTA-Blut + 20µl Protease + 200µl Buffer AL wurden in ein 1,5ml Eppendorf-Cup gegeben und durch Vortexen von 10 Sek. gemischt, danach erfolgte eine Inkubation bei 56°C für 10 Min. Nach anschließender Zugabe von 200µl Ethanol 96-100% wurde erneut 5 Sek. gevortext.

BINDEN: Die gesamte homogene Lösung 720µl wurde nun in das Spin column auf die Filter-Membran pipettiert und bei 8000 rpm 1 Min. zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen.

WASCHEN: 500µl Buffer AW 1 wurde auf die Filter-Membran pipettieren und nochmals für 1 Min bei 8000 rpm zentrifugiert und das Zentrifugat verworfen. Dann wurden 500µl Buffer AW 2 auf die Filter-Membran geben und bei 13000 rpm für 3 Min. zentrifugiert und das Zentrifugat erneut verworfen.

LÖSEN: Der Filter wurde auf ein neues Cup gesetzt und es wurden 100µl Buffer AE auf die Membran pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 Min. bei Raumtemperatur wurde nochmals für 1 Min. bei 8000 rpm zentrifugieren.

3.2.2.1 Spektrometrische Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA

Die Mengenbestimmung der DNA erfolgte - nach Verdünnung um den Faktor 100 – durch Absorptionsmessung im Photometer bei 260 nm. Anhand empirischer Vergleichsdaten kann die DNA-Konzentration durch folgende Formel bestimmt werden: Eine OD von 1 entspricht: 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Zur Reinheitsbestimmung wird zusätzlich

die Absorption durch Proteine bei 280 nm bestimmt. Der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ sollte mindestens 1,8 betragen.

Das gewonnene Zentrifugat enthielt DNA in einer Konzentration von 45-60ng/μl bei einem Verhältnis des Absorptionsquotienten A_{260}/A_{280} von 1,7 – 1,9 und einer durchschnittlichen Leukozytenzahl von $\sim 5 \times 10^6$ / ml. Das entsprach einer Gesamtkonzentration von 4,5-6μg DNA in 100 μl Lösungsmedium.

3.2.2.2 *Detektion von Nukleinsäuren durch Gel-Elektrophorese*

Grundprinzip aller elektrophoretischen Trennmethode ist die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld zu einer Elektrode umgekehrter Polarität.. Elektrophoresen werden zumeist in einer elektrisch neutralen, halbfesten Gelmatrix aus Agarose oder Polyacrylamid (PAGE = Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) durchgeführt. Nukleinsäuren besitzen aufgrund der Phosphatgruppen im Molekül eine negative Nettoladung. In vorgefertigte Taschen eines Gels eingebracht, wandern Nukleinsäuren nach Anlage einer elektrischen Spannung zur Anode. Diese Wanderung erfolgt umso schneller, je kleiner die Nukleinsäure-Moleküle sind. Die dabei zurückgelegte Strecke ist umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes der entsprechenden Nukleinsäure (Helling et al. 1974)

Agarose- und Polyacrylamid-Gele wirken wie molekulare Siebe. Die Größe der Poren begrenzt dabei die Geschwindigkeit der Wanderung des Nukleinsäure-Moleküls im Gel.. Während bei Agarosegelen die Agarosekonzentration die Porengröße bestimmt, kommt es bei den Polyacrylamid-Gelen auf das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid und dem Grad der Vernetzung an.

3.2.2.2.1 DNA-Detektion durch horizontale Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese ist die Standardmethode zur Trennung, Reinigung und Identifizierung von Nukleinsäuren und erlaubt die Trennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 70 Basenpaaren bis zu 60 Kilobasen. Für die Elektrophorese wurden Flachbettgelkammern der Firma Owle Scientific benutzt. Die Agarosekonzentration im Gel betrug 1%. Der Gellauf erfolgte jeweils in 1x TBE-Puffer. Die Nukleinsäuren wurden mit Ethidiumbromid angefärbt. Dieses planare Molekül interkaliert in die DNA und verstärkt damit sein Fluoreszenzverhalten unter UV-Anregung bei 320 nm, so dass die angefärbten Molekülbanden erkennbar werden. Die Ethidiumbromid-Konzentration betrug 2 µl pro 100 ml Laufpuffer.

Für alle Proben wurde nach der Isolation eine Kontrolle der DNA auf einem 1%-Agarosegel mit einem Volumen von insgesamt 12 µl: 2 µl DNA-Lösung + 6 µl GLS (Gel Loading Solution, 2x Konzentration) + 4 µl Aqua, je Probe und Geltasche mit Färbung im Ethidiumbromid-Bad und Detektion unter UV-Licht durchgeführt (s. Abb.1). Die Aufbewahrung der DNA erfolgt bei + 4°C.

Abb. 1: DNA auf 1%igem Agarose-Gel



1 2 3 4 5 6 M

1-6: isolierte DNA

M: Molecular weight Marker

3.2.3 PCR - Polymerasekettenreaktion

3.2.3.1 Grundlagen

Das Verfahren der Polymerasekettenreaktion (PCR), das die Molekulargenetik revolutioniert hat, wurde 1984 durch den Nobelpreisträger K. Mullis entwickelt. Mit dieser Methode können definierte Nucleinsäuresequenzen *in vitro* in einem einzigen Reaktionszyklus mit hoher Ausbeute amplifiziert werden. Dazu werden einzelsträngige Oligonukleotide (*Primer*) benötigt, die komplementär zu den 3'-Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize (*template*) sind. Eine DNA-Polymerase verlängert unter geeigneten Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxynukleosidtri-phosphaten (*dNTPs*) die an die Matrize angelagerten Primer am 3'-Ende entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize und synthetisiert so neue DNA-Stränge, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist. (*Newton und Graham 1994*).

Die gesamte Reaktion basiert auf drei, sich zyklisch wiederholenden Teilschritten bei jeweils unterschiedlichen Temperaturen. Im ersten Schritt, der *Denaturierung* der DNA-Doppelstränge (ca. 90°C) wird die DNA in Einzelstränge aufgespalten. Beim *Annealing*, dem zweiten Schritt (primerspezifisch zw. 50-74°C) hybridisieren die Oligonukleotidprimer mit den beiden DNA-Matrizensträngen und dienen damit im dritten Schritt, der *Polymerisation* (72°C), der DNA-Polymerase als Startmoleküle zur Kopierung der beiden Matrizenstränge. In jedem Zyklus verdoppelt sich die Menge des von den Startmolekülen eingerahmten Matrizenfragments und wird im folgenden Zyklus zum Ausgangsmaterial. Im nächsten Reaktionszyklus dienen auch die Produkte des vorangegangenen Zyklus als Matrizen für die DNA-Polymerase. Die im ersten Reaktionszyklus synthetisierten DNA-Stränge haben noch keine definierte Länge, da die DNA-Polymerase so lange DNA synthetisiert, bis sie entweder von allein anhält oder vom Beginn des zweiten Zyklus unterbrochen wird. Im zweiten Reaktionszyklus

dienen auch die Produkte des ersten Zyklus als Matrizen für die DNA-Polymerase. Die hierbei entstehenden DNA-Moleküle sind nunmehr in ihrer Länge durch die eingesetzten Primer definiert. Ab dem folgenden Zyklus vermehrt sich diese Zielsequenz exponentiell. Ihre Kopienzahl nach Abschluss der Reaktion kann nach der Gleichung $c = (2n-2n)x$ (c = Anzahl der Kopien; n = Anzahl der Zyklen; $2n$ = Produkte des ersten und zweiten Zyklus, deren Länge nicht definiert ist; x = Anzahl der Kopien der ursprünglichen DNA-Matrize) berechnet werden.. Nach 20 Zyklen sollte die gewünschte DNA um den Faktor 220 vermehrt sein. Allerdings liegt die Reaktionsausbeute im Schnitt nur bei ca. 85% . Zudem ist nach 20 – 25 Zyklen bei sinkender Effizienz nur noch eine lineare Zunahme der Amplifikate zu erwarten. Ursache dafür ist die im Reaktionsverlauf relativ zum Amplifikat zunehmend geringer werdende Primerkonzentration mit der Folge der Renaturierung der DNA-Matrizen. Um einen vorzeitigen Start der PCR zu vermeiden, wurden alle Reaktionsansätze auf Eis pipettiert.

3.2.3.2 *Analyse der Polymorphismen mittels RFLP basierter (converted) PCR*

Restriktions-Endonukleasen des Typs III spalten DNA an ganz spezifischen, meist palindromischen Sequenzen. Wenn durch Mutation eine Base in einer solchen Sequenz verändert wird, spaltet das betreffende Restriktionsenzym an dieser Stelle nicht mehr. Umgekehrt können durch Mutation neue Restriktionsstellen entstehen und es ergeben sich nach Behandlung mit Restriktions-Endonukleasen häufig Restriktionsfragmente unterschiedlicher Länge, die elektrophoretisch dargestellt werden können. Diese Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs) sind somit Indikatoren sequentieller Aberrationen in den Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme.

Außer für die Analyse des TNF- α Polymorphismus, der eine natürliche Restriktionsenzymkennungsstelle besitzt, wurde für alle anderen Polymorphismen eine RFLP basierte (converted) cPCR durchgeführt.

Wenn ein Polymorphismus keine natürliche für ein Restriktionsenzym erkennbare Schnittstelle aufweist, kann mittels spezieller Primer ein amplifiziertes PCR-Produkt dieses Polymorphismus so umgewandelt werden, dass es ein Basen-Mismatch enthält, das zu einem PCR-Produkt mit einer Restriktionsenzymschnittstelle für eines der beiden Allele führt. Daraus folgt, dass im Falle eines Einzelbasenaustauschs (SNP) entweder kein, ein oder beide Allele durch das geeignete Enzym geschnitten werden.

Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte mittels speziell hergestellter Primer (s. Tabelle 3-4), die eine falsche Base (oder eine natürliche Schnittstelle für ein Verdauungsenzym, wie für den TNF- α Polymorphismus) enthalten.

3.2.3.3 *Amplifikation des DNA-Fragments mittels converted PCR (cPCR)*

GERÄTE und MATERIALIEN

PCR – Maschine

- Wärme-/Brutschrank, Heizblock
- Gelkammern für PA-Gele, Glas- und Aluminiumplatten, Spacer
- Cups, Pipetten, Pipettenspitzen
- DNA
- Polyacrylamid, TBE, TAE

PCR-Mix Reagenzien:

- Aqua ad injectabilia
- Primer 3' und 5'
- Nukleotide (dNTPs), Puffer 10x Mg Konz
- Taq – Polymerase (Boehringer Mannheim)

Das Pipettieren der PCR erfolgte nach standardisiertem Schema: Es wurden 40µl Aqua je Cup und Probe vorgelegt und dann 2µl DNA je Cup pipettiert, anschließend wurde der PCR – Mix entsprechend der Anzahl der Proben angesetzt und je Cup 8µl PCR – Mix zugeben. Der so fertige PCR-Reaktionsansatz wurde dann in die programmierte und vorgeheizte PCR – Maschine gestellt. Die PCR-Bedingungen unterschieden sich für jeden Polymorphismus mit unterschiedlichen Zeiten und Temperaturen für Denaturierung, Annealing und Sequenzierung und sind im Folgenden aufgeführt.

Für IL-10-1082 und IL-10-819: 2 Minuten 95°C, gefolgt von 35 Zyklen mit 45`` 95°C, 45`` 59°C, 60`` 72°C und 5 Minuten 72°C.

IL-6-174: 2 Minuten 95°C, gefolgt von 30 Zyklen mit 60`` 95°C, 60`` 60°C, 60`` 72°C und 5 Minuten 72°C.

TNF α -308: 3 Minuten 94°C, 60`` 60°C, 60`` 72°C, gefolgt von 40 Zyklen mit 60`` 94°C, 60`` 60°C, 60`` 72°C und 5 Minuten 72°C.

TNF β -Intron1: 2 Minuten 95°C, gefolgt von 35 Zyklen mit 15`` 95°C, 30`` 65°C, 30`` 72°C und 5 Minuten 72°C. (s. Tabelle 3-6).

Tabelle 3-4: Primersequenzen und Restriktionsenzyme zur Genotypisierung

	<i>Spezifische Primerpaare</i>	Restriktionsenzyme
TNF-α -308	TAC ACC ATC TCC AGC ACA TAG AA CAA GAC AAC ACT AAG GCT TCT TGA GGA	Nco I
TNF-β Intron1	CTC CTG CAC CTG CTG CCT GGA TC GAA GAG ACG TTC AGG TGG TGT CAT	Nco I
IL-6-174	TTG TCA AGA CAT GCC AAG TGC T GCC TCA GAG ACA TCT CCA GTC C	Nla III
IL-10-819	GAT TCT CAG GCA CAT GTT TCC AC GTT AGC ACT GGT GTA CCC TTG TAC AGG TGA ATT AA	BseR I
IL-10-1082	TAC ACC ATC TCC AGC ACA TAG AA CAA GAC AAC ACT ACT AAG GCT TCT TGA GGA	Ase I

IL: Interleukin, TNF- α : Tumor Nekrose Faktor alpha

Tabelle 3-5: Schnittstellen der Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym Schnittstelle

Ase I:

5'...ATT[▼]AAT...3'
3'...TAAT[▲]TA...5'

BseR I:

5'...GAGGAG(N)₁₀[▼]...3'
3'...CTCCTC(N)₈[▲]...5'

Nco I:

5'...C[▼]CATGG...3'
3'...GGTACC[▲]...5'

Nla III:

5'...CATG[▼]...3'
3'...GTAC[▲]...5'

A: Adenin, T: Thymin, C: Cytosin, G: Guanin

Tabelle 2 : PCR-Bedingungen

Polymorphismus	PCR-Bedingung		
	<u>1 Zyklus</u>	<u>35 Zyklen</u>	<u>1 Zklus</u>
IL-10 –1082	1 x 2' 95°C	45'' 95°C	5' 72°C
IL-10 –819		45'' 59°C	
		45'' 72°C	
	<u>1 Zyklus</u>	<u>30 Zyklen</u>	<u>1 Zklus</u>
	2' 95°C	60'' 95°C	5' 72°C
IL-6 –174		60'' 60°C	
		60'' 72°C	
	<u>3 Zyklen</u>	<u>40 Zyklen</u>	<u>1 Zklus</u>
	3' 94°C	60'' 94°C	5' 72°C
TNF-α –308	60'' 60°C	60'' 60°C	
	60'' 72	60'' 72°C	
	<u>1 Zyklus</u>	<u>35 Zyklen</u>	<u>1 Zklus</u>
	2' 95°C	15'' 95°C	5' 72°C
TNF-β Intron1		30'' 65°C	
		30'' 72°C	

IL: Interleukin; TNF: Tumor Nekrose Faktor

Jetzt erfolgte die Amplifikation der durch die beiden Primer 3' + 5' markierten DNA-Sequenz aus der Gesamt-Leukozyten-DNA der Patienten/Probanden durch das Enzym Taq – Polymerase. Die Cups mit dem fertigen PCR – Produkt werden bei +4°C aufbewahrt.

Alle PCR-Reaktionen wurden entweder im ERICOMP Twin Block TM oder mit dem Gene Amp PCR System 9600 Perkin Elmer Thermocycler durchgeführt.

Die spezifischen PCR-Produkte wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (siehe Tabelle 3-4 und 3-5).

TECHNISCHER ABLAUF

Die Herstellung des PCR-Mix erfolgte in folgender Zusammensetzung: 40 µl Aqua, je 1 µl Primer, 1 µl dNTPs, 5µl Puffer 10xMg und 0.15µl Taq-Polymerase pro Probe. Für TNF-beta Intron-1 wurden anstatt 40µl nur 23µl Aqua verwendet.

Das Pipettieren der PCR erfolgte nach standardisiertem Schema: Es wurden Aqua je Cup und die Probe (2µl DNA je Cup) mit entsprechendem Volumen vorgelegt, dann wurde der PCR-Mix entsprechend der Anzahl der Proben angesetzt und je Cup 8µl PCR – Mix zugeben. Der so fertige PCR-Reaktionsansatz wurde dann sofort in die programmierte und vorgeheizte PCR-Maschine gestellt. Jetzt erfolgte die Amplifikation der durch die beiden Primer 3 + 5 markierten DNA-Sequenz aus der Gesamt-Leukozyten-DNA der Patienten / Probanden durch das Enzym Taq-Polymerase. Die Cups mit dem fertigen PCR – Produkt werden bei +4°C aufbewahrt.

Im Anschluss an die PCR erfolgte ein Restriktionsverdau mit dem entsprechenden Restriktionsenzymen s. Tabelle 2. 8µl des PCR-Produktes wurden in einem neuen Cup je Probe mit 2µl Mix aus 1µl Aqua, 0,7µl Restriktionsenzym – Puffer und 0,3µl Restriktions-Enzym Nco I bei 37°C für 2 Stunden im Wasserbad oder Brutschrank zu Reaktion gebracht.

3.2.3.3.1 Detektion der Restriktionsfragmente durch vertikale Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Polyacrylamid-Gele wurden erstmals 1959 von Raymond und Weintraub für eine Elektrophorese eingesetzt. Diese Gele entstehen durch Polymerisation der Acrylamid-Monomere zu langen Ketten und der kovalenten Bindung eines Crosslink-Reagenz. Der gewöhnlich benutzte Crosslinker ist N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis). Ammoniumpersulfat (APS) wird meist zur Bildung der drei zur Polymerisation notwendigen Radikale benutzt. NNN'-Tetramethylen-

diamin (TEMED), als „Beschleuniger“ zugesetzt, fördert die Bildung von sauerstofffreien Radikalen und katalysiert in einem Gemisch aus APS, Acrylamid und Bis die Polymerisation.. Die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese ist aufgrund ihrer höheren Trennschärfe besonders zur Auflösung von sehr kleinen Unterschieden in der Größe der Nukleinsäuren geeignet (10 – 250 Basenpaare). Es wurden Gelgrößen von 11 cm x 12 cm verwendet. Das Produkt des Restriktionsverdaues (10µl) wurde nach Zugabe von 2µl 6x GLS auf ein 8 % PAGE aufgetragen: 10µl je Tasche. Die Laufzeit betrug 60 Min. bei 140 Volt.

Die Detektion der Restriktionsfragmente und die Bestimmung des entsprechenden Genotyps erfolgte durch Gelelektrophorese auf 8%igem PA-(Polyacrylamid) Gel (PAGE) (s. Abb. 2-6).

Zur Kontrolle der amplifizierten DNA-Sequenzen wurden für jeden Polymorphismus einzelne „spot checks“ (Ausschnitte, Gelstanzen) zur Sequenzierung an die Fa. SeqLab versandt.

Abb. 2-6: Fotodokumentation der Gelelektrophorese der einzelnen Polymorphismen

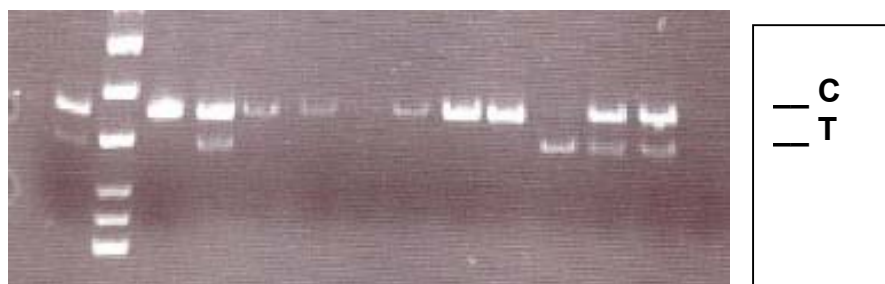
Abb.2: IL-6 – 174



M K₁ 3 4 5 K₂ 7 8 9 10

K₁: PCR-Produkt; K₂: neg Kontr.; ,9,10: GG (uncut); 3,4,5,7: CG (cut), 8: CC (total cut),

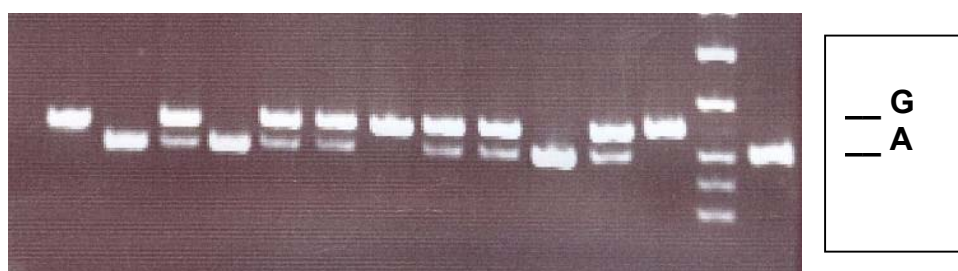
Abb.3: IL 10 –819



1 M K₁ 3 4 5 K₂ 7 8 9 10 11 12

1, 3,11, 12: CT (cut); K₁: pos Kontrolle CC (uncut); K₂: neg. Kontrolle; 4, 5, 7-9:CC (uncut); 10:TT (total cut)

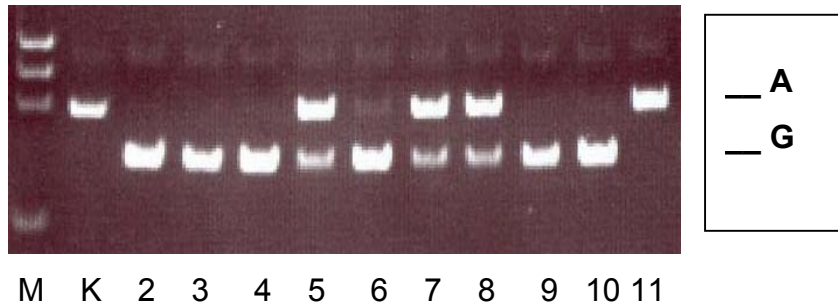
Abb.4: IL 10 –1082



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 K₁ M K₂

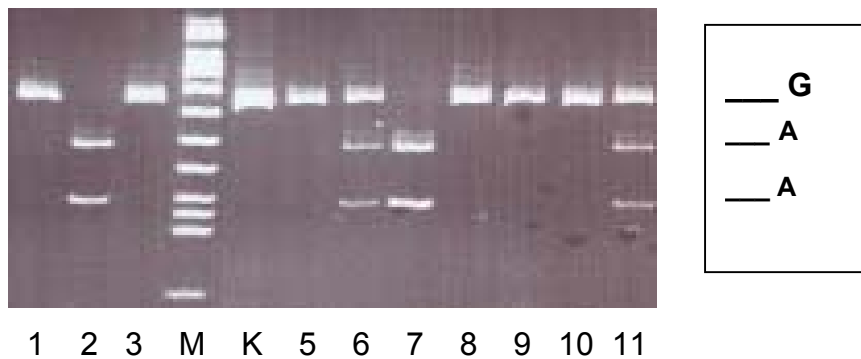
K₁: PCR-Produkt; K₂: Kontrolle AA (total cut); 1, 7: GG (uncut); 2, 4, 10: AA (total cut); 3, 5, 6, 8, 9, 11:GA (cut)

Abb.5: TNF- α -308



K: pos. Kontrolle AA (uncut); 2-4, 6, 9,10: GG (total cut); 5, 7, 8: AG (cut); 11:AA (uncut)

Abb.6: TNF- β Intron1



K: PCR-Produkt; 1, 3, 5, 8, 9, 10: GG (uncut); 2 und 7:AA (total cut); 6 und 11: GA (cut)

Abb.1-6: M: molecular weight marker; A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin

3.3 Statistische Verfahren

Zur Überprüfung der Verteilung der unterschiedlichen Genotypen innerhalb der einzelnen Gruppen wurden unterschiedliche statistische Verfahren angewendet. Für die Kontrollgruppen wurde für jeden einzelnen Polymorphismus mit dem Chi-Quadrat-Test oder einem speziellen Computerprogramm, der Genetic Data Analysis, das Hardy-Weinberg Gleichgewicht (HWG) überprüft.

Das Hardy-Weinberg Gleichgewicht entspricht der erwarteten Genotyp Verteilung, die auf der beobachteten Häufigkeit (p) für das Allel A und (q) für das Allel B basiert. Die Formel für die Berechnung lautet: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, mit:

p^2 = erwartete Häufigkeit für den homozygoten Typ AA

q^2 = erwartete Häufigkeit für den homozygoten Typ BB

$2pq$ = erwartete Häufigkeit für den heterozygoten Genotyp AB

Würden die beobachteten Häufigkeiten im Kontrollkollektiv von den erwarteten Häufigkeiten abweichen, wäre dies ein Hinweis auf das Vorliegen eines Selektions-Bias. Abweichungen vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests überprüft.

Für jede Gruppe bzw. Untergruppe der Indexpatienten, die der COPD und die der Bronchialkarzinome (kleinzellige (SCLC), alle nichtkleinzelligen (NSCLC) und die Plattenepithel- (PE) und Adenokarzinome (AC)) wurden für jeden einzelnen Polymorphismus zwei univariate Gruppenvergleiche durchgeführt.

Die Frequenz der SNPs wurde zwischen den gematchten Paaren verglichen, innerhalb der Index-Gruppen miteinander und entsprechend deren Untergruppen, sowie mit den beiden Kontrollgruppen verglichen. Je nach Vergleich wurden dabei unterschiedliche statistische Verfahren angewendet: Für den Vergleich der gematchten Paare eine bedingte logistische Regression, für die nicht gematchten Analysen entweder der Cochran Armitage Test oder eine logistische Regression.

Der Cochran Armitage Test wurde zur Trendabschätzung verwendet, um zu überprüfen, ob das Erkrankungsrisiko mit der Anzahl der Risikoallele zunimmt. Dieser Test bezieht die Merkmale Alter, Geschlecht und Rauchverhalten, die sich allerdings nur in der Populationskontrolle signifikant unterschieden, jedoch nicht mit ein. Bei den gematchten Paaren stimmten diese Merkmale durch den Vorgang des Matchens überein.

Wenn sich bei der Trendabschätzung durch den Cochran Armitage Test signifikante Unterschiede zeigten wurde für diese Allele der Chi-Quadrat Test durchgeführt und die entsprechende Odds Ratio bestimmt.

Vor Anwendung der logistischen Regression wurde zunächst die Frage eines Dosiseffektes eines der Allele geprüft. Für keinen der Polymorphismen zeite sich ein solcher Dosiseffekt. Anschließend wurde für die logistische Regression eines der beiden Allele als Basis-Allel verwendet und überprüft, ob die Allelenfrequenz zwischen den Gruppen bzw das Tragen eines Allels in den Gruppen unterschiedlich verteilt war. Bei signifikanten Unterschieden erfolgte die zusätzliche Prüfung mit McNemar und Fisher`s Exaktem Test. Im Falle der Untersuchung von mehreren Genvariationen erfolgte die Adjustierung durch Anwendung der konservativen Bonferroni Korrektur. Bei Untersuchung nur einer Genanalyse wurde zur statistischen Berechnung des Gruppenvergleichs der Chi-Quadrat Test und Fisher`s Exakter Test angewendet.

Zuerst wurden die Genotypfrequenzen zwischen den Index-Patienten und den Populationskontrollen zur Trendabschätzung mit dem Cochran-Armitage Test verglichen. Mit diesem Test ist aber noch keine Spezifität für ein genetisches Modell erfüllt, sondern er beschreibt lediglich das mit steigender Anzahl von Risiko-Allelen an einem mutmaßlichen „Krankheitsort“ verbundene steigende Krankheitsrisiko.

Eine exakte Bestimmung wurde immer dann durchgeführt, wenn die zu erwartende Allelenfrequenz niedriger war als 5.

Als Zweites wurden die Genotypen der Index-Gruppen mit den eins zu eins gematchten Kontrollgruppen durch die bedingte logistische Regression verglichen. Für Polymorphismen, die in einem der beiden Verfahren eine nominale Signifikanz ($p < 0.05$) aufweisen können die Odds Ratio und das korrespondierende Konfidenzintervall bestimmt werden.

Im Anschluss daran, untersuchten wir den IL-10 -1082 Polymorphismus, der im Gesamtgruppenvergleich der COPD-Gruppe mit $p = 0.05$ signifikant war getrennt für zwei Untergruppen der COPD mit unterschiedlichen Schweregraden (I° und II° zusammen und III°) gegen die gesamte Populationskontrolle. Zusätzlich wurden die Genotypen kombiniert, eingeteilt in zwei Gruppen (G - Allel tragend oder nicht) und innerhalb aller 3 Gruppen verglichen mittels Chi-Quadrat-Test, wofür ebenfalls die geschätzte Odds Ratio für „krankheitsrelevant“ beim Tragen des G-Allels und das korrespondierende 95% - Konfidenzintervall (KI) berechnet wurden.

In der Bronchialkarzinomgruppe haben wir für den IL-10 -1082 Polymorphismus, der auch hier nennenswert signifikant war ($p < 0.05$) und einem dominanten Modell mit einer größeren Häufigkeit der Genotypen AG und GG bei den BC-Gruppen zu folgen scheint, einen post-hoc Test durchgeführt und somit die Frequenzen der G-Allel Träger zwischen den Fällen und der Populationskontrolle mittels des Chi-Quadrat-Tests verglichen. Es wurde die Odds-Ratio „*for being a case*“ beim Tragen von wenigstens einem G-Allel und das korrespondierende 95%-Konfidenzintervall (KI) ermittelt.

Die nominalen p-Werte für jeden Test wurden bestimmt und mit einem adäquaten Signifikanzwert verglichen (Boehringer S 2000; Nyholt DR 2001). Dies muss entsprechend der multivariaten Analyse in dieser Studie und möglicherweise auch für das potentiell multivariate Testing

einer deutlich größeren Anzahl von Kandidatengenpolymorphismen angeglichen werden. Bei Anwendung der konservativen Bonferroni-Korrektur wäre das ein $\alpha=0.0009$ (5 Polymorphismen mit je 6 unabhängigen Tests für die initiale Analyse) oder wie in der Literatur vorgeschlagen ein generelles Signifikanzlevel für genetische Assoziationsstudien mit einem $\alpha<10^{-6}$ (*Nyholt DR 2001; . Risch N and Merikangas N 1996*).

Die Analysen wurden mit SAS V8 (SAS Institute, Cary, USA) und der StatXact 5 (Cytel Software) für exakte Tests am Institut für Medizinische Biometrie der Universität Marburg mit Unterstützung durch Frau Dr. A. Dempfle durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Häufigkeitsverteilungen der Genotypen der einzelnen Polymorphismen für die untersuchten Gruppen, unterteilt in die der COPD und die der Bronchialkarzinome und die statistische Auswertung dieser Ergebnisse dargestellt.

4.1 COPD-Ergebnisse (siehe auch Tabelle 4-1)

Für den TNF- α -308 Polymorphismus zeigt sich in der Populationskontrolle (n=131) für den Genotyp AA eine Frequenz von 3 (2.3%), für AG 36 (29.8%) und für GG 89 (67.9%). In der gematchten Kontrollgruppe (n=113) für AA 5 (4.4%), AG 28 (24.6%) und GG 81 (71.0%). In der gesamten COPD Gruppe eine Frequenz für AA von 4 (3.5%), AG 36 (31.9%), GG 73 (64.6%).

Der Vergleich von COPD-Gruppe und Populationskontrolle mit dem Cochran Armitage Test zur Trendabschätzung ergab einen p-Wert von 0.506, zwischen der COPD-Gruppe und den gematchten Kontrollen mittels konditionierter logistischer Regression ein p-Wert von 0.454 und somit keinen signifikanten Unterschied.

Für den TNF- β Intron1 Polymorphismus zeigt sich in der Populationskontrolle (n=131) für den Genotyp AA eine Frequenz von 55 (42.6%), für AG 57 (44.2%) und für GG 17 (13.7%). In der gematchten Kontrollgruppe (n=113) für AA 49 (43.0%), AG 58 (50.9%) und GG 7 (6.1%). In der gesamten COPD Gruppe eine Frequenz für AA von 53 (46.9%), AG 50 (44.2%), GG 10 (8.9%). Der p-Wert für den Vergleich von COPD-Gruppe und Populationskontrollen ergab 0.318, für die COPD versus gematchter Kontrollgruppe ist p=0.829, somit in beiden Fällen nicht signifikant.

Für den IL-6 -174 Polymorphismus zeigt sich in der Populationskontrolle (n=131) für den Genotyp CC eine Frequenz von 24 (18.3%), für

GC 54 (41.2%) und für GG 53 (40.5%). In der gematchten Kontrollgruppe (n=113) für CC 12 (10.6%), GC 52 (46.0%) und GG 49 (43.4%). In der gesamten COPD Gruppe eine Frequenz für CC von 20 (17.7%), GC 52 (46.0%), GG 41 (36.3%). Für den Vergleich COPD versus Population ist $p = 0.702$ und versus den gematchten Kontrollen $p = 0.078$, ebenfalls kein signifikanter Unterschied.

Für den IL-10 -819 Polymorphismus zeigt sich in der Populationskontrolle (n=131) für den Genotyp CC eine Frequenz von 71 (54.2%), für TC 53 (40.5%) und für TT 7 (5.3%). In der gematchten Kontrollgruppe (n=113) für CC 77 (68.1%), TC 31 (27.4%) und TT 5 (4.4%). In der gesamten COPD Gruppe eine Frequenz für CC von 70 (62.5%), TC 36 (32.1%), TT 6 (5.4%). Für COPD vs. Population ist $p = 0.281$, für COPD vs. Gematchten Kontrollen $p = 0.327$ und nicht signifikant.

Für den IL-10 -1082 Polymorphismus zeigt sich in der Populationskontrolle (n=131) für den Genotyp AA eine Frequenz von 53 (40.5%), für AG 57 (43.5%) und für GG 21 (16.0%). In der gematchten Kontrollgruppe (n=113) für AA 19 (17.0%), AG 68 (60.7%) und GG 25 (22.3%). In der gesamten COPD Gruppe eine Frequenz für AA von 28 (24.8%), AG 57 (50.4%), GG 28 (24.8%).

Der Vergleich von COPD-Gruppe und Populationskontrolle mit dem Cochran Armitage Test zur Trendabschätzung ergab einen p-Wert von 0.008, der zwischen der COPD Gruppe und den gematchten Kontrollen mittels konditionierter logistischer Regression ein p-Wert von 0.541 und somit für den Vergleich von COPD mit den gematchten Kontrollen keinen, aber bei einem $p < 0.005$ einen signifikanten Unterschied zur Populationskontrolle.

Die Untersuchung dieses Polymorphismus bei den verschiedenen Schweregraden der COPD, eingeteilt in zwei Gruppen Grad I und II zusammengekommen und Grad III, ergeben sich die folgenden Ergebnisse: COPD I°/II° (n=89) hat für den Genotyp AA eine Häufigkeit von 21 (23.6%), für AG 46 (51.7%) und GG 22 (24.7%). Für die COPD

III° (n=24) für AA 7 (29.9%), AG 11 (45.8%) und GG 6 (25.0%). Die p-Werte für den Vergleich zwischen der COPD III°-Unter- und der Populationsgruppe ist 0.267, für den mit der COPD I°/II°-Untergruppe 0.009. Somit ergibt sich für die Untergruppe der COPD I°/II° ein signifikanter Unterschied (s. Tabelle 4-2).

Tabelle 4-1: Frequenzen der verschiedenen Genotypen im Vergleich mit der COPD Gruppe

	COPD (n=113)	Populations- kontrollgruppe (n=131)	p-Wert (COPD vs. Populations- kontrolle)	gematchte Kontrollgruppe (n=113)	p-Wert (COPD vs. gematchte Kontrolle)
IL-6 -174					
- CC	20 (17.7)	24 (18.3)	0.702	12 (10.6)	0.078
- GC	52 (46.0)	54 (41.2)		52 (46.0)	
- GG	41 (36.3)	53 (40.5)		49 (43.4)	
IL-10 -819					
- CC	70 (62.5)	71 (54.2)	0.281	77 (68.1)	0.327
- TC	36 (32.1)	53 (40.5)		31 (27.4)	
- TT	6 (5.4)	7 (5.3)		5 (4.4)	
IL-10 -1082					
- AA	28 (24.8)	53 (40.5)	0.008	19 (17.0)	0.541
- AG	57 (50.4)	57 (43.5)		68 (60.7)	
- GG	28 (24.8)	21 (16.0)		25 (22.3)	
TNF-α -308					
- AA	4 (3.5)	3 (2.3)	0.506	5 (4.4)	0.454
- AG	36 (31.9)	39 (29.8)		28 (24.6)	
- GG	73 (64.6)	89 (67.9)		81 (71.0)	
TNF-β Intron1					
- AA	53 (46.9)	55 (42.6)	0.318	49 (43.0)	0.829
- AG	50 (44.2)	57 (44.2)		58 (50.9)	
- GG	10 (8.9)	17 (13.2)		7 (6.1)	

dargestellt sind absolute Zahlen mit %-Angaben in Klammern: n(%), p-Werte sind angegeben für den Vergleich von COPD mit der Kontrollgruppe, für die Populationskontrollgruppe wurde der Cochran-Armitage Trend-Test basierend auf den Genotypen und für die gematchten Kontrollen wurde die konditionierte logistische Regression angewendet.

Tabelle 4-2 : Genotypfrequenzen von IL-10-1082 der untersuchten Gruppen

IL-10 -1082 Genotypen	Populations- kontrollgruppe (n=131)	COPD I°/II° (n=89)	p-Wert (COPD I°/II° vs. Populations- kontrolle)	COPD III° (n=24)	p-Wert (COPD III° vs. Populationskontrolle)
AA	53 (40.5)	21 (23.6)	0.009	7 (29.2)	0.267
AG	57 (43.5)	46 (51.7)		11 (45.8)	
GG	21 (16.0)	22 (24.7)		6 (25.0)	

Analyse der Untergruppen der verschiedenen Schweregrade, angegeben sind absolute Zahlen, % in Klammern.

4.1.1 Statistische Auswertung COPD

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Genotypfrequenzen von IL-6-174, IL-10-819, IL-10 -1082, TNF- α -308, TNF- β Intron1 zwischen den COPD-Fällen und den gematchten Kontrollen (Tabelle 4-1).

Der Vergleich der COPD-Gruppe mit der Populationskontrolle zeigte einen signifikanten Unterschied der IL-10-1082 Genotypfrequenz beim Tragen des G-Allels, mit einer größeren Häufigkeit in der COPD-Gruppe. Dieser Shift zu häufigeren G-Allelen war in der gematchten Kontrollgruppe sogar noch deutlicher. Die getrennte Analyse der Untergruppen mit unterschiedlichem COPD-Schweregrad zeigte, dass sich dieser Shift nicht auf eine bestimmte Untergruppe begrenzte, sondern sich die Verteilung der Genotypen in den Untergruppen COPD I°/II° und COPD III° entsprach. Allerdings waren hierbei die Unterschiede zwischen dem Schweregrad III und der Populationskontrolle aufgrund der kleineren Gruppengröße weniger signifikant.

Wenn man die Genotypen in zwei Gruppen einteilt, jene die das G-Allel tragen und jene, die homozygote G-Allel Träger sind, dann beträgt die geschätzte Odds Ratio für das Auftreten einer COPD 2.06 beim Tragen

von G-Allelen (95%-KI=[1.18, 3.58], $p=0.009$). Für die gematchten Kontrollen gegenüber den Populationskontrollen ist diese Odds Ratio 3.16 (95%-KI=[1.74, 5.73], $p=0.0001$).

4.2 Bronchialkarzinom-Ergebnisse (s. Tabelle 4-3)

Die TNF- α -308 Polymorphismus Genotypfrequenzen der Bronchialkarzinomgruppen sind bei den SCLC ($n=40$) für AA 0 (0%) AG 11 (27.5%) und GG 29 (72.5%), die der NSCLC ($n=77$) für AA 1 (1.3%), AG 25 (32.5%) und GG 51 (66.2%). Für die Untergruppen der NSCLC: Plattenepithelkarzinome (PE) ($n=40$) für AA 1 (2.5 %), AG 15 (37.5 %) und GG 24 (60.0%) und der Adenokarzinome (AC) ($n=26$) für AA 0 (0 %), AG 8 (30.8%) und GG 18 (69.2%). Der Vergleich mit der Populationsgruppe ergibt einen p-Wert für die SCLC-Gruppe von 0.58, für die NSCLC 0.91, PE 0.49 und für die AC 0.93.

Der Vergleich mit der gematchten Kontrollgruppe entsprechend für SCLC $p=1.00$, NSCLC $p=0.13$, PE $p=0.20$ und AC $p=0.18$ jeweils nicht signifikant.

Die TNF- β Intron1 Polymorphismus Genotypfrequenzen der Bronchialkarzinomgruppe sind für die SCLC ($n=40$) für AA 18 (45%) AG 17 (42.5%) und GG 5 (12.5%), die der NSCLC ($n=77$) für AA 33 (42.9%), AG 39 (50.6%) und GG 5 (6.5%). Für die Untergruppen der NSCLC bei den Plattenepithelkarzinomen (PE) ($n=40$) für AA 14 (35.0%), AG 24 (60.0%) und GG 2 (5.0%) und bei den Adenokarzinomen (AC) ($n=26$) für AA 11 (42.3%), AG 13 (50.0%) und GG 2 (7.7%). Der Vergleich mit der Populationsgruppe ergibt einen p-Wert für die SCLC-Gruppe von 0.81, für die NSCLC 0.47, PE 0.99 und für die AC 0.85. Der Vergleich mit der gematchten Kontrollgruppe entsprechend für SCLC 0.26, NSCLC 0.58, PE 0.67 und AC 0.11 jeweils nicht signifikant.

Die IL-6 -174 Polymorphismus Genotypfrequenzen der Bronchialkarzinomgruppe sind für die SCLC (n=40) für CC 4 (10.3%) CG 16 (41.0%) und GG 19 (48.7%), der NSCLC (n=77) für CC 13 (16.9%), CG 36 (46.8%) und GG 28 (36.4%), für die Untergruppen der NSCLC bei den Plattenepithelkarzinomen (PE) (n=40) für CC 4 (10.0%), CG 19 (47.5%) und GG 17 (42.5%) und bei den Adenokarzinomen (AC) (n=26) für CC 5 (19.2%), CG 11 (42.3%) und GG 10 (38.5%). Der Vergleich mit der Populationsgruppe ergibt einen p-Wert für die SCLC-Gruppe von 0.22, für die NSCLC 0.80, PE 0.42 und für die AC 0.85. Der Vergleich mit der gematchten Kontrollgruppe entsprechend für die SCLC 0.27, NSCLC 0.28, PE 1.0 und AC 0.62 diese Werte sind jeweils nicht signifikant.

Die IL-10 -819 Polymorphismus Genotypfrequenzen der Bronchialkarzinomgruppe sind bei den SCLC (n=40) für CC24 (60.0%), TC 14 (35.0%) und TT 2 (5.0%), der NSCLC (n=77) für CC 42 (54.5%), TC 31 (40.3%) und TT 4 (5.2%). Für die Untergruppen der NSCLC bei den Plattenepithelkarzinomen (PE) (n=40) für CC 16 (40.0%), CT 20 (50.0%) und TT 4 (10.0%) und den Adenokarzinomen (AC) (n=26) für CC 18 (69.2%), CT 8 (30.8%) und TT 0 (0%). Der Vergleich mit der Populationsgruppe ergibt einen p-Wert für die SCLC-Gruppe von 0.57, für die NSCLC 0.95, PE 0.12 und für die AC 0.14. Der Vergleich mit der gematchten Kontrollgruppe entsprechend für SCLC 0.72, NSCLC 0.54, PE 0.12 und AC 0.42, jeweils nicht signifikant.

Die IL-10 -1082 Polymorphismus Genotypfrequenzen der Bronchialkarzinomgruppe beträgt für die SCLC (n=40) für AA 6 (15.4%) AG 21 (53.8%) und GG 12 (30.8%), der NSCLC (n=77) für AA 24 (31.6%), AG 33 (43.4%) und GG 19 (25.0%). Für die Untergruppen der NSCLC, die Plattenepithelkarzinome (PE) (n=40) für AA 13 (32.5%), AG 17 (42.5%) und GG 10 (25.0%) und die Adenokarzinome (AC) (n=26) für AA 5 (19.2%), AG 14 (53.9%) und GG 7 (26.9%). Der Vergleich mit der Populationsgruppe ergibt einen signifikanten p-Wert für die SCLC-Gruppe von 0.002, für die NSCLC 0.09, PE 0.20 und für die AC 0.05.

Der Vergleich mit der gematchten Kontrollgruppe entsprechend für SCLC 0.48, NSCLC 0.81, PE 0.72 und AC 0.44.

Für das Auftreten des G-Allels (IL-10 1082_G) in den signifikanten Gruppen zeigt sich bei der SCLC Gruppe eine Häufigkeit dieses Allels von 33 (84.6%) und bei der AC-Gruppe von 21 (80.8%), der Populationskontrollgruppe 78 (59.5%) und den gematchten Kontrollen 92 (80%) hieraus ergibt sich für den Vergleich zwischen der Populationsgruppe und der SCLC Gruppe ein $p=0.004$ und eine Odds Ratio (OR) von 3.74 mit einem 95%Konfidenzintervall (95%KI) von 1.52 - .16, für die AC Gruppe ist $p=0.041$, die OR: 2.85 mit einem 95%KI von 1.04 - .80.

In anderen untersuchten Gruppen (*Donger C et al. 2001; Galley HF 2003; Hajeer AH 1998; Lim S 1998*) zeigt sich für das Auftreten dieses Allels eine gleichmäßige Häufigkeitsverteilung zwischen 47-52%, 50% für die gesamten Kollektive, während es für unsere Populationsgruppe 41% sind. Dieser Unterschied ist hochsignifikant ($p=0.0002$, Chi-Quadrat Test).

Tabelle 4-3:

Frequenzen der verschiedenen Genotypen der untersuchten Gruppen der Bronchialkarzinome:
SCLC

	SCLC (n=40)	Populations- kontrolle (n=131)	p-Wert (SCLC vs. Populations kontrolle)	gematchte Kontrolle (n=40)	p-Wert (SCLC vs. gematchte Kontrolle)
IL-6 -174					
-CC	4 (10.3)	24 (18.3)	0.22	7 (17.5)	0.27
-GC	16 (41.0)	54 (41.2)		19 (47.5)	
-GG	19 (48.7)	53 (40.5)		14 (35.0)	
IL-10 -819					
-CC	24 (60.0)	71 (54.2)	0.57	24 (60.0)	0.72
-TC	14 (35.0)	53 (40.5)		12 (30.0)	
-TT	2 (5.0)	7 (5.3)		4 (10.0)	
IL-10 -1082					
-AA	6 (15.4)	53 (40.5)	0.002	7 (17.5)	0.48
-AG	21 (53.8)	57 (43.5)		24 (60.0)	
-GG	12 (30.8)	21 (16.0)		9 (22.5)	
TNF-α -308					
-AA	0 (0)	3 (2.3)	0.58	1 (2.5)	1.00
-AG	11 (27.5)	39 (29.8)		9 (22.5)	
-GG	29 (72.5)	89 (67.9)		30 (75.0)	
TNF-β Intron1					
-AA	18 (45.0)	55 (42.6)	0.81	25 (62.5)	0.26
-AG	17 (12.5)	57 (44.2)		10 (25.0)	
-GG	5 (12.5)	17 (13.2)		5 (12.5)	

angegeben sind absolute Zahlen, %-Angaben in Klammern: n(%), p-Werte dienen dem Vergleich von SCLC und der entsprechenden Kontrollgruppe, für die Populationskontrolle wurde der Cochran-Armitage Trend-Test basierend auf den Genotypen, für die gematchten Kontrollen die konditionierte logistische Regression verwendet.

Tabelle 4-4:

Frequenzen der verschiedenen Genotypen innerhalb untersuchten Gruppen: NSCLC

	NSCLC (n=77)	Populations- kontrolle (n=131)	p-Wert (NSCLC vs. Populations- kontrolle)	gematchte Kontrolle (n=77)	p-Wert (NSCLC vs. gematchte Kontrolle)
IL-6 -174					
-CC	13 (16.9)	24 (18.3)	0.80	5 (6.7)	0.28
-GC	36 (46.8)	54 (41.2)		41 (54.7)	
-GG	28 (36.4)	53 (40.5)		29 (38.7)	
IL-10 -819					
-CC	42 (54.5)	71 (54.2)	0.95	47 (61.8)	0.54
-TC	31 (40.3)	53 (40.5)		24 (31.8)	
-TT	4 (5.2)	7 (5.3)		5 (6.6)	
IL-10 -1082					
-AA	24 (31.6)	53 (40.5)	0.09	16 (21.3)	0.81
-AG	33 (43.4)	57 (43.5)		44 (58.7)	
-GG	19 (25.0)	21 (16.0)		15 (20.0)	
TNF-α -308					
-AA	1 (1.3)	3 (2.3)	0.91	1 (1.3)	0.13
-AG	25 (32.5)	39 (29.8)		15 (19.5)	
-GG	51 (66.2)	89 (67.9)		61 (79.3)	
TNF-β Intron1					
-AA	33 (42.9)	55 (42.6)	0.47	36 (47.4)	0.58
-AG	39 (50.6)	57 (44.2)		35 (46.0)	
-GG	5 (6.5)	17 (13.2)		5 (6.6)	

angegeben sind absolute Zahlen, %-Angaben in Klammern: n(%), p-Werte dienen dem Vergleich von NSCLC und der entsprechenden Kontrollgruppe, für die Populationskontrolle wurde der Cochran-Armitage Trend-Test basierend auf den Genotypen, für die gematchten Kontrollen die konditionierte logistische Regression verwendet.

Tabelle 4-5:

Frequenzen der verschiedenen Genotypen innerhalb untersuchten Gruppen:
Plattenepithelkarzinome (PE)

	PE (n=40)	Populations- Kontrolle (n=131)	p-Wert (PE vs. Populations- kontrolle)	gematchte Kontrolle (n=40)	p-Wert (PE vs. gematchte Kontrolle)
IL-6 -174					
-CC	4 (10.0)	24 (18.3)	0.42	4 (10.3)	1.0
-GC	19 (47.5)	54 (41.2)		18 (46.1)	
-GG	17 (42.5)	53 (40.5)		17 (43.6)	
IL-10 -819					
-CC	16 (40.0)	71 (54.2)	0.12	25 (62.5)	0.12
-TC	20 (50.0)	53 (40.5)		12 (30.0)	
-TT	4 (10.0)	7 (5.3)		3 (7.5)	
IL-10 -1082					
-AA	13 (32.5)	53 (40.5)	0.20	7 (18.4)	0.72
-AG	17 (42.5)	57 (43.5)		24 (63.2)	
-GG	10 (25.0)	21 (16.0)		7 (18.4)	
TNF-α -308					
-AA	1 (2.5)	3 (2.3)	0.49	1 (2.5)	0.20
-AG	15 (37.5)	39 (29.8)		8 (20.0)	
-GG	24 (60.0)	89 (67.9)		31 (77.5)	
TNF-β Intron1					
-AA	14 (35.0)	55 (42.6)	0.99	15 (38.5)	0.67
-AG	24 (60.0)	57 (44.2)		22 (56.4)	
-GG	2 (5.0)	17 (13.2)		2 (5.1)	

angegeben sind absolute Zahlen, %-Angaben in Klammern: n(%), p-Werte dienen dem Vergleich von Plattenepithel und der entsprechenden Kontrollgruppe, für die Populationskontrolle wurde der Cochran-Armitage Trend-Test basierend auf den Genotypen, für die gematchten Kontrollen die konditionierte logistische Regression verwendet.

Tabelle 4-6:

Genotypfrequenzen der unterschiedlichen Genotypen innerhalb der untersuchten Gruppen:
Adenokarzinome (AC)

	AC (n=26)	Populations- kontrolle (n=131)	p-Wert (AC vs. Populations- kontrolle)	gematchte Kontrolle (n=26)	p-Wert (AC vs. gematchte Kontrolle)
IL-6 -174					
-CC	5 (19.2)	24 (18.3)	0.85	0 (0)	0.62
-GC	11 (42.3)	54 (41.2)		17 (68.0)	
-GG	10 (38.5)	53 (40.5)		8 (32.0)	
IL-10 -819					
-CC	18 (69.2)	71 (54.2)	0.14	15 (60.0)	0.42
-TC	8 (30.8)	53 (40.5)		8 (32.0)	
-TT	0 (0)	7 (5.3)		2 (8.0)	
IL-10 -1082					
-AA	5 (19.2)	53 (40.5)	0.05	7 (26.9)	0.44
-AG	14 (53.9)	57 (43.5)		14 (53.9)	
-GG	7 (26.9)	21 (16.0)		5 (19.2)	
TNF-α -308					
-AA	0 (0)	3 (2.3)	0.93	0 (0)	0.18
-AG	8 (30.8)	39 (29.8)		4 (15.4)	
-GG	18 (69.2)	89 (67.9)		22 (84.6)	
TNF-β Intron1					
-AA	11 (42.3)	55 (42.6)	0.85	16 (61.5)	0.11
-AG	13 (50.0)	57 (44.2)		10 (38.5)	
-GG	2 (7.7)	17 (13.2)		0 (0)	

angegeben sind absolute Zahlen, %-Angaben in Klammern: n(%), p-Werte dienen dem Vergleich von Adenokarzinom und der entsprechenden Kontrollgruppe, für die Populationskontrolle wurde der Cochran-Armitage Trend-Test basierend auf den Genotypen, für die gematchten Kontrollen die konditionierte logistische Regression verwendet.

Tabelle 4-7: Frequenzen der IL-10-1082 Allele

	Population n (%)	klinische Kontrollen n (%)	SCLC n (%)	AC n (%)	p-Wert (vs. Population)	OR [95% KI]
IL-10 -1082_G	78 (59.5)	92 (80.0)	33 (84.6)		p=0.004	3.74 [1.52-.16]
	78 (59.5)	92 (80.0)		21 (80.8)	p=0.041	2.85 [1.04-.80]

OR = Odds Ratio, Population: n = 131, gematchte Kontrollen = NSCLC-match + SCLC-match: n = 117, SCLC = kleinzellige Bronchialkarzinome: n = 40, 95%KI = 95%-Konfidenzintervall

4.2.1 Statistische Auswertung – BC

Die Genotypfrequenzen und sowohl die Ergebnisse der gematchten als auch der nicht gematchten Analysen sind in den Tabelle 4-3 bis 4-7 dargestellt.

Für keinen der untersuchten Marker und keine der untersuchten Gruppen von Bronchialkarzinomen zeigte der Vergleich von Fällen und eins zu eins gematchten Kontrollen einen signifikanten Unterschied der Frequenz der Genotypen von TNF- α -308, TNF- β Intron1, IL-6 -174 und IL-10 -819.

Der Vergleich der Bronchialkarzinomgruppe und der Populationskontrollgruppe zeigte einen relevanten Unterschied lediglich für den IL-10-1082 Marker. Dieser zeigt sich am deutlichsten in der Gruppe der kleinzelligen Bronchialkarzinome (p=0.002), allerdings findet man den gleichen Trend in der Gruppe der nichtkleinzelligen Bronchialkarzinome (p=0.09) ebenso, wie in den Untergruppen der Adenokarzinome (p=0.05) und der Plattenepithelkarzinome (p=0.2).

Diese Assoziation ist durch eine höhere Rate von Genotypen mit G-Allelen bei den Erkrankten gekennzeichnet.

Die geschätzte Odds Ratio (OR) beim Tragen von nur einem G-Allel ein SCLC zu bekommen beträgt 3.74 (95%-KI=[1.46, 9.45]), für die nicht-

kleinzelligen Bronchialkarzinome ist die OR = 1.47 (95%-KI=[0.81, 2.67]), für Adenokarzinome OR = 2.85 (95%-KI=[1.01, 8.04]) und für Plattenepithelkarzinome OR = 1.41 (95%-KI=[0.67, 2.98]).

Trotzdem diese beobachteten Assoziationen durchaus deutlich sind, sind sie bei der Anwendung des strikten Bonferroni-korrigierten Signifikanzlevels auf die untersuchte Probenanzahl nicht ausreichend.

Bei der Analyse der unterschiedlichen BC-Gruppen (SCLC: n=40, NSCLC: n=77, SCC: n=40 und AC: n=26) im Vergleich mit der Populationskontrollgruppe (n=131) zeigt sich eine 80%ige Spezifität (bei $\alpha=0.0009$) beziehungsweise für Unterschiede bei der Trägerfrequenz in einer Größenordnung von 0.35 (SCLC), 0.28 (NSCLC), 0.35 (SCC) und 0.42 (AC).

In der gematchten Analyse liegt die Spezifität bei 80% (bei $\alpha=0.0009$), beziehungsweise die Unterschiede der Trägerfrequenz in einer Größenordnung von 0.25 (SCLC), 0.18 (NSCLC), 0.25 (SCC) und 0.31 (AC).

In Anbetracht dessen, dass geringere Effekte sicherlich sowohl klinische als auch biologische Relevanz zeigen könnten, können wir hiermit für die Gene für die hier keine Assoziation gezeigt werden konnte eine Rolle in der Ätiologie der Bronchialkarzinome nicht ausschließen.

4.3 Statistische Auswertung - Kontrollgruppen

In der Populationskontrolle entsprachen alle Marker dem HWE ($p>0.1$)

In der gematchten Kontrollgruppe fand sich für den IL-10-1082 Polymorphismus mit $p=0.04$ und den TNF- β Intron1 Polymorphismus mit $p=0.06$ eine diskrete Abweichung.

Nachdem die Genotypisierung durch zwei unabhängige Systeme kontrolliert wurde, gehen wir nicht davon aus dass hier ein Typisierungsfehler vorliegt. Es könnte sich hier stattdessen um einen Effekt handeln, der durch die Wahl des Kontrollgruppenkollektivs, das sich hauptsächlich aus KHK-Patienten zusammensetzt, bedingt ist.

Möglicherweise stellt dieser Polymorphismus für dieses Kollektiv einen ebenfalls relevanten Marker dar.

In der Populationskontrollgruppe entsprachen alle Marker dem HWE ($p > 0.1$). In der gematchten Kontrollgruppe zeigte der Polymorphismus IL-10-1082 ($p = 0.05$) diskrete Abweichungen vom HWE. Nachdem die Genotypen durch zwei unabhängige „Rater“ kontrolliert wurden gehen wir hier nicht von einem Typisierungsfehler aus. Es könnte sich stattdessen um einen Effekt resultierend aus der Zusammenstellung dieser Kontrollgruppe handeln, in der sich zum Großteil Patienten mit KHK befinden, und dieser Marker bei diesem Kollektiv ebenfalls eine Relevanz haben könnte.

5.0 DISKUSSION

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Promoter-Polymorphismen von TNF- α -308, TNF- β Intron1, IL-6 -174, IL-10 -819 und IL-10 -1082 in Form einer Fall-Kontroll- und Assoziationsstudie bei Patienten mit COPD und Bronchialkarzinomen untersucht. Die vorliegende Untersuchung ist unserer Kenntnis nach die erste Analyse, die Polymorphismen von IL-6, IL-10, und TNF bei Patienten mit Bronchialkarzinomen untersucht. Es wurde den Fällen, COPD unterschiedlicher Schweregrade und Bronchialkarzinome unterschiedlicher Histologie, jeweils eine nach Alter, Geschlecht und Rauchverhalten gematchte klinische Kontrollgruppe von Patienten mit normaler Lungenfunktion und eine nicht gematchte Populationskontrollgruppe gegenübergestellt und diese miteinander verglichen. Die Daten zeigen für die Genotypen der Polymorphismen von TNF- α -308, TNF- β Intron 1, IL-6 -174 und IL-10 -819 keine signifikanten Unterschiede.

Ein signifikanter Unterschied fand sich allerdings für den IL-10 -1082 Polymorphismus, zum einen zwischen der COPD-Gruppe und der Populationskontrolle, der interessanterweise im Vergleich mit den gematchten Kontrollen nicht beobachtet werden konnte, und zum anderen für die Bronchialkarzinome (IL-10-1082_G Allel) im Vergleich zur Populationskontrollgruppe, besonders für die beiden Untergruppen der kleinzelligen Karzinome und der Adenokarzinome.

5.1 Methodischer Ansatz

Trotzdem inzwischen das gesamte menschliche Genom entschlüsselt ist, ist die Suche nach Suszeptibilitätsgenen nicht einfacher geworden. Es sind im wesentlichen 2 Methoden, die hier für die Identifizierung solcher Gene in Frage kommen: Zum einen Kopplungsstudien und zum anderen Assoziationsstudien. Beide weisen Limitierungen auf. So ist es problematisch die Erkrankungen COPD und Bronchialkarzinome mittels Kopplungsuntersuchungen in betroffenen Familien zu analysieren, da einerseits die Frage der Erbllichkeit der Lungenfunktion bis dato nicht abschließend geklärt ist und andererseits die Erkrankungen üblicherweise einen so späten Manifestationszeitpunkt haben, dass andere betroffene oder potentiell betroffene Verwandte noch nicht erkrankt oder schon verstorben sind. Fall-Kontroll-Studien haben den Vorteil, dass bei der Untersuchung von Kandidatengenen nach einem Gen geforscht wird, das in einem plausiblen Zusammenhang mit der Erkrankung steht. Die eingeschränkte Beurteilbarkeit ergibt sich allerdings genau hierdurch, nämlich durch die Untersuchung schon bekannter Gene. Desweiteren bestehen häufig große Schwierigkeiten gute und passende Kollektive zu erstellen. Sollen beispielsweise nur ethnisch identische Personen eingeschlossen werden, ist die Gruppengröße häufig begrenzt, der Einschluss unterschiedlicher ethnischer Gruppen führt dagegen zu einer eingeschränkten Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit verschiedener Studien. Außerdem ist es erforderlich die Kontrollen hinsichtlich genetisch unabhängiger Risikofaktoren möglichst vergleichbar zu machen. Eine daraus resultierende Limitation der Gruppengröße oder der Vergleichbarkeit der Kontrollen führt häufig ebenfalls zu einer eingeschränkten Vergleichbarkeit der Studien. Daher gelten Assoziationsstudien ihrem Wesen nach primär für die Populationen in denen sie erhoben wurden. Es handelt sich dennoch um einen experimentellen Ansatz, der Auskunft über mögliche Phänotyp-Genotyp-Korrelationen geben kann.

Um die Limitierung durch eine nicht optimale Vergleichbarkeit der Kontrollen möglichst klein zu halten werden in der vorliegenden Arbeit jeweils zwei Kontrollkollektive integriert, eine Populationskontrolle und ein gematchtes Kontrollkollektiv, dessen Personen die wichtigsten Risikofaktoren (Nikotinkonsum, Alter, Geschlecht) mit den Personen der Patientenkollektive teilen. Für eine optimale Vergleichbarkeit mit den Phänotypen von BC und COPD wären daher vor allem lungengesunde, ältere, männliche Personen einzuschließen. Ein entsprechendes Kollektiv ist unter gesunden Personen schwierig zu generieren. In der vorliegenden Studie werden daher Patienten mit koronarer Herzerkrankung als Kontrollen verwendet, da auch diese die Variablen Alter, Rauchen und männliches Geschlecht üblicherweise aufweisen. Dies hatte jedoch zur Folge, dass die daraus entstandene Kontrollgruppe zum Großteil lungengesunde Personen repräsentierte, die an einer anderen Erkrankung litten. Aus diesem Grund und um die Allelenfrequenz der zu untersuchenden Gene in einem gesunden ethnisch identischen, kaukasischen Kollektiv zu dokumentieren wurde zusätzlich eine Populationskontrollgruppe untersucht.

Aufgrund der grenzwertigen Signifikanz bei relativ kleinen Gruppengrößen der BC-Untergruppe der Adenokarzinome könnte es sich hierbei auch um falsch positive Ergebnisse handeln. Wie für alle Assoziationsstudien geltend, ist eine Überprüfung dieser Ergebnisse an einem sehr viel größeren Kollektiv notwendig.

Eine weitere Erklärung für die hier beobachteten Unterschiede der IL-10 -1082 Genotypfrequenz könnten allerdings auch durch Populationsstratifikation bedingt sein (*Pritchard und Rosenberg 1999*):

In vergleichbaren Kontrollgruppen anderer Untersuchungen, die allerdings überwiegend nicht dem kaukasischen Raum entstammten, variierte die Allelenfrequenz für IL-10 -1082_G zwischen 47-52% (*Lazarus M et al. 1997; Hajeer AH et al. 1998; Lim S et al. 1998 und Galley HF et al. 2003*) bzw. lag im Durchschnitt für alle 1442 Kontrollen

dieser Studien bei 50%, während sie in unserer Populationsgruppe bei 41% lag.

Dies könnte implizieren, dass die Allelenfrequenz unserer Populationsgruppe aus unbekannten Gründen niedriger gewesen wäre als in der Gesamtbevölkerung. Ein solcher systematischer Fehler wäre prinzipiell möglich. Da aber alle untersuchten Gruppen ethnisch identisch waren und im geographischen Einzugsgebiet keine wesentlichen Veränderungen durch Migration oder Immigration bestehen, IL-10 vermutlich keinen Einfluss auf die Lebenserwartung hat und keine anderen Ursachen für eine populationsbedingte Stratifikation gegeben waren, auch weder Alter noch Geschlecht (die ebenfalls in den beiden Gruppen differieren) als sog. „Confounder“ fungieren sollten, denn der Polymorphismus ist von diesen Faktoren unabhängig (*Smith GD und Ebrahim S 2003; Little J und Khoury MJ 2003*), ist ein solcher systematischer Fehler nicht anzunehmen.

Die Gruppengröße in den jeweils vorliegenden Kollektiven ist begrenzt, lässt aber eine zuverlässige statistische Analyse zu und ist für die Suche nach einem prinzipiellen Zusammenhang ohne Zweifel ausreichend. Dennoch müssten die hier erhobenen Daten immer auch kritisch vor diesem Hintergrund betrachtet und wie üblicherweise bei Assoziationsstudien, in einer sehr viel größeren Studie überprüft werden.

5.2 COPD

Der für die COPD charakteristische Entzündungsprozess betrifft sowohl die bronchialen Strukturen, als auch das Lungenparenchym. In bronchialen Biopsien von Patienten mit COPD zeigt sich eine Infiltration mit neutrophilen und mononukleären Zellen (*Jeffrey PK et al. 1998*). Biopsien bei Ex-Rauchern zeigen einen ähnlichen Entzündungsprozess, wie er auch bei Rauchern beobachtet wird, sodass vermutlich eine persistierende Entzündung der Atemwege bestehen bleibt, wenn sie einmal in Gang gekommen ist (*Turato G et al. 1995*).

Bei der Regulation dieser Entzündungsreaktion spielen Makrophagen, die durch exogene Noxen, wie zum Beispiel Zigarettenrauch aktiviert werden, eine wichtige Rolle. Für den Entzündungsprozess und die Chemotaxis im Rahmen dieser Entzündungsreaktion sind Mediatoren wie die Interleukine 1, 6, 8 und 10 und TNF wesentliche Faktoren und könnten die Entzündungsantwort im Bereich der Atemwege beeinflussen. Diese Überlegung wird durch klinische Beobachtungen unterstützt, die eine inverse Korrelation zwischen Zigarettenrauchen und FeV₁, dem prozentualen Anteil an Neutrophilen und der IL-6 und IL-8 Konzentrationen in der BAL von Rauchern zeigen. TNF- α dagegen korreliert mit dem prozentualen Anteil an Neutrophilen (*Soler N et al. 1999*).

Mögliche Assoziationen des TNF- α -308 Polymorphismus mit COPD sind in unterschiedlichen Populationen nicht übereinstimmend beschrieben. Bei Taiwanesen (*Huang S-I et al. 1997*) und Japanern (*Sakao S et al. 2001; Sandford AJ et al. 2001*) wurde er mit dem Auftreten einer COPD assoziiert. Bei einem irischen Kollektiv scheint der homozygote Genotyp TNF- α -308_A mit einem schnell voranschreitenden Verlust der Lungenfunktion und einer schlechten Prognose der COPD in Zusammenhang zu stehen (*Keatings VM et al. 2000*). Andere Studien konnten jedoch keinen Zusammenhang von TNF- α oder TNF- β Polymorphismen, weder mit dem Auftreten einer COPD, noch mit dem Schweregrad oder der Prognose der Erkrankung bei kaukasischen

Kollektiven zeigen (Sandford AJ et al. 2001; Higham MA et al. 2000; Ferrarotti I et al. 2003).

Die vorliegende Arbeit unterstützt diese negativen Ergebnisse. Es wurde keine Korrelation zwischen den Genotypen von TNF- α -308 und TNF- β Intron1 nachgewiesen. Auch für den hier in einem COPD Kollektiv erstmalig analysierten IL-6 -174 (G/C) Polymorphismus konnte keine Assoziation zur COPD gezeigt werden.

IL-10 wird durch T-Lymphozyten und Makrophagen produziert und hemmt die Entzündungsantwort, indem es zu einer Verminderung proinflammatorischer Zytokine beiträgt (Howard 1992; de Waal 1991). Jedes der beiden IL-10-1082_(G/A) Allele zeigt unterschiedliche Effekte auf die Transkription von IL-10 in vitro (Turner DM et al. 1997), die Bindungsaktivität zu Transkriptionsfaktoren (Reuss E et al. 2002) und die Regulation von konstitutiven mRNA Konzentrationen (Suarez A et al. 2003).

In der Literatur findet man widersprüchliche Daten, die Modulation der IL-10 Sekretion in vitro und in vivo betreffend. Eine durch Concanavalin A stimulierte gesteigerte IL-10 Produktion bei menschlichen Lymphozyten scheint mit dem IL-10-1082_G Allel assoziiert zu sein (Turner DM et al. 1997). Andere Studien haben dagegen eine verminderte IL-10 Produktion nach Stimulation mit LPS (Lipopolysacchariden) (Eskdale J et al. 1998) und in vivo nach kardiopulmonaler Bypass-Operation (Galley HF et al. 2003) beobachtet. Diese Ergebnisse sind aufgrund der unterschiedlichen Ansätze nur schwer vergleichbar. Zudem handelt es sich hier um unterschiedliche Phänotypen, sodass für die COPD anhand dieser Daten keine Voraussagen bezüglich der Wirkung des Effektes der Genregulation gemacht werden können. In einem asiatischen Kollektiv konnten für die COPD Abweichungen der IL-10 Konzentrationen gezeigt werden. Im induzierten Sputum von COPD-Patienten zeigten sich deutlich niedrigere IL-10 Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Nichtrauchern (Takanashi S et al. 1999). Diese Resultate können jedoch

nur bei schon manifester Erkrankung beobachtet werden und scheinen nicht für die Induktion der Krankheit verantwortlich zu sein.

In der vorliegenden Arbeit tritt das „high-producer“-Allel IL-10 -1082_G, häufiger bei Patienten mit COPD auf. Durch eine limitiert induzierbare Entzündungsaktivität, aufgrund höherer IL-10 Aktivität/Spiegel könnte es zu einer Chronifizierung der Entzündungsreaktion kommen. Zum einen könnte beispielsweise durch eine gehemmte initiale Entzündungsreaktion eine fehlende primäre Beseitigung der entzündungsauslösenden Faktoren erfolgen. Eine solche Reaktionslage könnte zur Persistenz entzündungsauslösender Faktoren, so zu rekurrierenden Atemwegsinfektionen führen, und so eine Rolle für die Entstehung und den Progress der COPD spielen. Als zweites könnte der Unterschied in der IL-10 Expression durch Unterdrückung der Th-2 Antwort, die eine nichtallergische Form der Atemwegsentszündung induziert, dazu beitragen. Weiter könnte IL-10 durch Hochregulation des bcl-2 Proteins die Apoptose von T- und B-Zellen verhindern (*Levy Y et al. 1994*), woraus eine Persistenz der Entzündungszellen resultieren und zu einem Fortschreiten der Atemwegsentszündung führen würde. IL-10 moduliert zudem auch die Freisetzung von Proteasen und Antiproteasen durch ortständige Makrophagen (*Lim S et al. 2000*) und könnte auf diesem Weg auch zu einer Chronifizierung beitragen.

Aktuell weiß man aber weder, ob die Variabilität der IL-10 Expression einen Einfluss auf den Entzündungsprozess der COPD hat, noch ob der Genort, die Polymorphismuslokalisation selbst oder ein anderer gekoppelter Locus zur Entwicklung einer COPD beiträgt, oder einen Einfluss auf die Prognose hat. Anhand der bisher bekannten Daten ist ein solcher Zusammenhang jedoch nicht unwahrscheinlich.

Das IL-10-1082_G Allel war bei den COPD-Fällen und bei den gematchten Kontrollen im Vergleich zur Populationskontrollgruppe erhöht. Die Verteilung der IL-10 -1082 Genotypen in der

Populationskontrolle liegt deutlich niedriger als in anderen kaukasischen Kontrollkollektiven, sodass hier trotz der Abweichung von den anderen Kollektiven aufgrund der Gegenläufigkeit tatsächliche Unterschiede zwischen der COPD-Gruppe, den gematchten Kontrollen und der Populationskontrollgruppe vermuten lässt. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse scheint sich die hier betrachtete gematchte Kontrollgruppe von anderen Kontrollgruppen zu unterscheiden.

Bei der gematchten Kontrollgruppe wurden die Variablen Alter, Geschlecht und Rauchverhalten durch Matchen angeglichen, um eine höhere Übereinstimmung für den Vergleich mit der COPD-Gruppe zu erhalten. Nahezu alle gematchten Kontrollen sind KHK-Patienten, hierdurch wird eine homogene Gruppe mit einer anderen Form einer chronischen, nicht pulmonalen Erkrankung repräsentiert.

Die chronische Entzündung gilt für die COPD und möglicherweise auch für die KHK als zugrundeliegender Pathomechanismus. Zudem entsprechen sich Alter, Geschlecht und Rauchverhalten als bekannte Risikofaktoren.

Die signifikant erhöhte Frequenz des IL-10 -1082_G Allels könnte darauf hinweisen, dass bei beiden chronischen Erkrankungen Pathomechanismen im Zusammenhang mit IL-10 und Rauchverhalten eine Rolle spielen. Möglicherweise ist für die COPD und die KHK gleichermaßen eine genetisch beeinflusste alterierte Entzündungsreaktion von Bedeutung.

Auszuschließen ist nicht, dass das IL-10 -1082_G Allel mit jeweils unterschiedlichen phänotypischen Auswirkungen korreliert, die ohne einen direkten Zusammenhang, jeweils einzeln in der multifaktoriellen Genese der COPD und der KHK eine Rolle spielen.

So wie für das A-Allel schon eine Assoziation mit Autoimmunerkrankungen gezeigt werden konnte (*Lazarus M et al. 1997, Hajeer AH et al. 1998, Tagore A et al. 1999.*) wäre hier für das G-Allel eine ähnliche systemische Grundlage im Sinne einer generalisierten latent persistierenden Entzündungsreaktion denkbar, die moduliert durch den

exogenen Faktor des Zigarettenrauchens oder auch anderer Noxen, entsprechend zu den unterschiedlichen Phänotypen prädisponiert. Dies würde die Hypothese der COPD als Systemerkrankung unterstützen.

Es ist nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen, dass die vorliegenden signifikanten Ergebnisse auf einen systematischen Fehler bei Erstellung der Populationsgruppe beruhen. Sie weicht leichtgradig von den Allelfrequenzen anderer Kontrollgruppen ab. Wie jedoch schon unter 5.1. erläutert ist ein solcher Fehler unwahrscheinlich, sodass die vorliegenden Ergebnisse als zuverlässig angesehen werden sollten.

5.3 Bronchialkarzinome

Das individuelle Krebsrisiko ist durch lokale Faktoren im Bereich der Atemwege, die individuelle Antwort auf umweltbedingte Mutagene und die spezifische Entzündungsantwort beeinflusst. Für die COPD, eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, verursacht durch Zigarettenrauchen, ist bekannt, dass sie zur Entwicklung von Bronchialkarzinomen beiträgt (*Agudo A et al. 2000; Petty T et al. 1997; Skillrud D et al. 1986*), ebenso wie die chronische Entzündung selbst (*Malkinson A et al. 2000*).

Zusätzlich konnten bei Rauchern und bei Patienten mit Lungenkrebs Abweichungen von Zytokinkonzentrationen im Serum und in der bronchioalveolären Lavage (BAL) nachgewiesen werden (*Ariaz-Diaz J et al. 1994; Dowlati A et al. 1999; Takanashi S et al. 1999; DeVita F et al. 2000; Chen YM et al. 2001*).

Neue experimentelle Belege, die die Rolle der Entzündung bei der Entwicklung von Lungenkrebs nachdrücklich betonen, resultieren aus Untersuchungen an unterschiedlichen Inzuchtstämmen von Mäusen (*Askling J et al. 1999*), die die Entzündung als wichtigen Faktor sowohl der initialen, als auch der konsekutiven protrahierten epithelialen Zellveränderung durch entzündungsbedingte Freisetzung von Oxidantien (reactive oxygen species ROS), Chemo-/Zytokinen und proangiogenen Faktoren nahelegen. Hierbei konnten bei der Maus unterschiedliche Lokalisationen, die eine Rolle bei der Entwicklung von Lungentumoren spielen identifiziert werden. Diese Loci entsprechen den für eine Asthmaerkrankung relevanten beim Menschen. Hierzu zählen die Suszeptibilitätsgene für Lungenerkrankungen und Entzündungsprozesse, einschließlich TNF- α , das schon früher in den Prozess der Entwicklung von Lungenkrebs miteinbezogen wurde (*Übersicht hierzu bei Amos CU et al. 1999*).

Die vorliegende Untersuchung zeigt für die Patienten mit SCLC und Adenokarzinom eine Verschiebung des IL-10 -1082 Polymorphismus in Richtung des IL-10-1082_G Allels. Somit scheint dieses Allel mit dem Auftreten dieser Untergruppen der Bronchialkarzinome assoziiert zu sein.

Aktuell ist aber weder der Einfluss der unterschiedlichen IL-10 Expression auf die Entwicklung von Bronchialkarzinomen im Allgemeinen, noch die Rolle im Bezug auf die verschiedenen histologischen Untergruppen verstanden.

Genetisch bedingt höhere IL-10 Konzentrationen könnten eine Bedeutung für beides, sowohl für die Entstehung, als auch den Progress von Bronchialkarzinomen haben, da für die Expression von IL-10 eine Korrelation zwischen Tumervaskularisation (*Hatanaka H et al. 2000 und 2001*) und der klinischen Prognose bei NSCLC (*Takanashi S et al. 1999; Fishman D et al. 1998*) gezeigt werden konnte.

IL-10 ist im Serum und in anderen Sekreten von Bronchialkarzinompatienten erhöht (*Ariaz-Diaz J et al. 1994*) und wird von Tumorzellen/Zellen produziert, die in der direkten lokalen Umgebung des Karzinoms/NSCLC zu finden sind (*Agudo A et al. 2000*). Hiermit scheinen bestimmte Eigenschaften bereitgestellt, die einen hemmenden Einfluss auf die Ausbildung einer Antitumorimmunität haben (*Wang P et al. 1994*).

Interessanterweise wurden IL-10 Konzentrationen in vorausgegangenen Untersuchungen mit der Prognose von fortgeschrittenen NSCLC korreliert (*Takanashi S et al. 1999*). Außerdem wurde für IL-10 bei Rauchern (Zigarettenrauchern) ein Effekt auf die Freisetzung von Proteasen und Antiproteasen durch Atemwegsmakrophagen gezeigt, einem Gleichgewichtssystem, das bei der Entwicklung von Bronchialkarzinomen ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen scheint (*Kube D et al. 1996*).

Adenokarzinome und SCLC haben ihren Ursprung in unterschiedlichen Vorläuferzellen und weisen eine unterschiedliche Empfindlichkeit für das Rauchen auf. Eine erhöhte Frequenz des IL-10 -1082_G Allels in

beiden Arten von Bronchialkarzinomen könnte auf einen generellen Mechanismus, der dieser Assoziation unterliegt, hinweisen, z. B. eine gesteigerte Entzündungsantwort. Das wiederum könnte zur Krebsentstehung auf unterschiedlichen Wegen beitragen, so dass bei Adenokarzinomen eine nichtraucherassoziierte und bei kleinzelligen Karzinomen (SCLC) eine raucherassoziierte Entzündungsreaktion die ausschlaggebende Rolle spielt.

Die Korrelation des IL-10 Polymorphismus sowohl mit der COPD, der KHK, als auch den Untergruppen der Bronchialkarzinome lässt daran denken, dass möglicherweise tatsächlich ein Zusammenhang in der generellen Reaktion auf Zigarettenrauch besteht, da alle Erkrankungen diesen Risikofaktor gemeinsam haben. Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um eine solche Hypothese zu stützen.

5.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend zeigt die Untersuchung der fünf Zytokinpolymorphismen keine Assoziation für TNF- α -308, TNF- β Intron-1, IL-6 174 und IL-10 -819, mit dem Auftreten einer COPD oder eines Bronchialkarzinoms.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen jedoch nicht sicher ausschließen, dass TNF- α , - β oder IL-6 Polymorphismen bei der Entstehung von Bronchialkarzinomen eine Rolle spielen. Ein solcher Zusammenhang kann durch die hier vorliegende Untersuchung allerdings nicht nachgewiesen werden.

Der funktionelle Promoter Polymorphismus im IL-10 Gen, IL-10 -1082, der mit einer alterierten IL-10 Expression in vitro korreliert ist, scheint jedoch sowohl mit COPD als auch mit Bronchialkarzinomen assoziiert zu sein. Bei den Bronchialkarzinomen besteht die Assoziation mit den Untergruppen der Adenokarzinome und der kleinzelligen Karzinome.

Das funktionelle Allel IL-10 -1082_G, welches mit einem alterierten IL-10 Level korreliert, könnte durch eine limitiert induzierbare initiale Entzündungsaktivität eine Chronifizierung der Entzündungsreaktion bedingen, beispielsweise durch die daraus resultierende fehlende initiale Beseitigung der entzündungsauslösenden Faktoren. Eine entsprechende Reaktionslage könnte somit im Sinne einer Prädisposition für eine chronifizierte Entzündungsreaktion pathogenetisch für die COPD und Lungentumoren eine Rolle spielen und so eine erhöhte Suszeptibilität bedingen.

Ein weiterer Aspekt wäre die Möglichkeit, dass bisher noch nicht bekannten Genen, durch Kopplung bzw Linking zur Krankheitsentstehung beitragen.

Einschränkend wird in der Studie allerdings eine statistisch zwar ausreichende, aber doch limitierte Gruppengröße untersucht, daher ist die Möglichkeit eines falsch positiven Ergebnisses nicht auszuschließen. Aufgrund einer ähnlichen Häufigkeitsverteilung des Polymorphismus in dem KHK dominierten Kollektiv der gematchten Kontrollgruppe liegt die

Überlegung nahe, ob das IL-10 -1082_G Allel ein Marker für chronisch entzündliche Erkrankungen darstellt, der in Abhängigkeit des gemeinsamen Risikofaktors Zigarettenrauchen zum tragen kommt.

Vor diesem Hintergrund weist das Ergebnis der vorliegenden Arbeit jedoch auf die Relevanz von Entzündungsvorgängen in der multifaktoriellen Genese sowohl der COPD als auch bei Bronchialkarzinomen hin.

LITERATURVERZEICHNIS

1. **Agudo A**, Ahrens W, Benhamou E, Benhamou S, Boffetta P, Darby SC, Forastiere F, Fortes C, Gaborieau V, Gonzalez CA, Jockel KH, Kreuzer M, Merletti F, Pohlabein H, Richiardi L, Whitley E, Wichmann HE, Zambon P, Simonato L: Lung cancer and cigarette smoking in women: a multicenter case-control study in Europe. *Int J Cancer* 2000; 88(5):820-827.
2. **Alvarez-Granda L**, Cabero-Perez MJ, Bustamante-Ruiz A, Gonzalez-Lamuno D, Delgado-Rodriguez M und Garcia-Fuentes M: PI SZ phenotype in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1997; 52(7):659-71.
3. **Amos CI**, Xu W und Spitz MR: Is there a genetic basis for lung cancer susceptibility? *Recent Results Cancer Res* 1999; 151:3-12.
4. **Antó JM**, Vermeire P, Vestbo J and Sunyer J: Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease *Eur Respir J* 2001; 17:982-994.
5. **Arias-Díaz J**, Vara E, Torres-Melero J, García C, Baki W, Ramírez-Armengol JA, Balibrea JL: Nitrite/Nitrate and Cytokine Levels in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Lung Cancer Patients. *Cancer* 1994; 74:1546-1551.
6. **Askling J**, Grunewald J, Eklund A, Hillerdal G, Ekblom A: Increased risk for cancer following sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1668-72.
7. **Astemborski JA**, Beaty TH und Cohen BH: Variance components analysis of forced expiration in families. *Am J Med Genet* 1985; 21(4): 741-53.

8. **Barnett TB**, Gottovi D und Johnson AM: Protease inhibitors in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1975;111(5):587-93.
9. **Bartmann K**, Fooke-Achterrath M, Koch G et al.: Heterozygosity in the Pi-system as a pathogenetic cofactor in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Eur J Respir Dis* 1985;66(4):284-96.
10. **Bauer AK**, Malkinson AM und Kleeberger SR: Susceptibility to neoplastic and non-neoplastic pulmonary disease in mice: genetic similarities. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287:L685-703.
11. **Beck GJ**, Doyle CA und Schachter EN: Smoking and lung function. *Am Rev Respir Dis* 1981; 123(2):149-55.
12. **Black LF** und Kueppers F: Alpha-1-antitrypsin deficiency in nonsmokers. *Am Rev Respir Dis* 1978; 117(3):421-8.
13. **Brantly ML**, Paul LD, Miller BH, Falk RT, Wu M und Crystal RG: Clinical features and history of the destructive lung disease associated with alpha-1-antitrypsin deficiency of adults with pulmonary symptoms. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138(2):327-36.
14. **British Thoracic Society**: BTS guidelines for the management of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1997, 52:Suppl 5.
15. **Burch PR**: Smoking and lung cancer. Tests of a causal hypothesis. *J Chronic Dis* 1980; 33(4):221-38.

16. **Carbone D**: Smoking and cancer. *Am J Med* 1992; 93(1A):13S-17S.
17. **Celedon JC**, Lange C, Raby BA et al.: The transforming growth factor-beta 1 (TGFB1) gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Hum Mol Genet* 2004; 13(15): 1649-56.
18. **Chen S**, Tang D, Xue K et al.: DNA repair gene XRCCI and XPD polymorphisms and risk of lung cancer in a Chinese population. *Carcinogenesis* 2002; 23(8): 1321-5.
19. **Chen YM**, Yang WK, Whang-Peng J, Tsai CM, Perng RP: An analysis of cytokine status in serum and effusions of patients with tuberculosis and lung cancer. *Lung Cancer* 2001; 31:25-30.
20. **Chen Y**, Horne SL, Rennie DC und Dosman JA: Segregatio analysis of two lung function indices in a random sample of young families: the Humboldt Family Study. *Genet Epidemiol* 1996; 13(1):35-47.
21. **Cohen BH**, Diamond EL, Graves CG, Kreiss P, Levy DA, Menkes HA, Permutt S, Quaskey S, Tockman MS: A common familial component in lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 1997; 2(8037):523-6.
22. **Cohen BH**, Ball Jr. WC, Brashears S et al.: Risk factors in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am J Epidemiol* 1977; 105:223-32.
23. **Cohen BH** (Johns Hopkins U. School of Hygiene and Public Health, Baltimore, MD 21205), Ball WC jr, Brashears S, Diamond EL, Kreiss P, Levy DA, Menkes HA, Permutt S and Tockman MS:

- Risk factors in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Epidemiol 1977; 105:223-232,1977.
24. **Devor EJ** und Crawford MH: Family resemblance for normal pulmonary function. Ann Hum Biol 1984; 11(5): 439-48.
25. **Dowlati A**, Levitan N, Remick SC : Evaluation of interleukin-6 in bronchoalveolar lavage fluid and serum of patients with lung cancer. J Lab Clin Med 1999; 134:405-409.
26. **Doll R**, Peto R, Wheatley K, Gray R und Sutherland I: Mortality in relation to smoking: 40 years observations on male British doctors. Bmj 1994; 309(6959):901-11.
27. **Doll R** und Peto R: The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. J Natl Cancer Inst 1981; 66(6):1191-308.
28. **Eskdale J**, Gallagher G, Verweij CL, Keijsers V, Westendorp RG und Huizinga TW: Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95(16):9465-70.
29. **Falk GA** und Briscoe WA: Alpha-1-antitrypsin deficiency in chronic obstructive pulmonary disease. Ann Intern Med 1970;72(3):427-9.
30. **Falk GA**: Chronic obstructive pulmonary disease and heterozygous alpha-1-antitrypsin deficiency. Ann Intern Med 1970; 72(4):595-6.

31. **Ferrarotti I**, Zorzetto M, Becaria M et al.: Tumor necrosis factor family genes in a phenotype of COPD associated with emphysema. *Eur Respir J* 2003; 21(3): 444-9.
32. **Fishman D**, Faulds G, Jeffrey R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P: The effect of novel polymorphisms in the interleukin 6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102:1369-1376.
33. **Fletcher CM**: Letter: Natural history of chronic bronchitis. *Br Med J* 1976; 1(6025): 1592-3.
34. **Fry WA**, Phillips JL, Menck HR: Ten year survey of lung cancer treatment and survival in hospitals in the United States: a national cancer data base report. *Cancer* 1999; 86:1867-76.
35. **Galley HF**, Lowe PR, Carmichael RL, Webster NR: Genotype and interleukin-10 responses after cardiopulmonary bypass. *BJ Anaesthesia* 2003; 91(3):424-6.
36. **Gaudet MM**, Egan KM, Lissowska J, Newcomb PA, Brinton LA, Titus-Ernsto L, Yeager M, Chanock S, Welch R, Peplonska B, Trentham-Dietz A, Garcia-Closas M: Genetic variation in tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha (*TNF-LTA*) and breast cancer risk. *Hum Genet* 2007; 121(3-4):483-490.
37. **Goeze A**, Schluns K, Wolf G, Thasler Z, Petersen S und Petersen I: Chromosomal imbalances of primary and metastatic lung adenocarcinomas. *J Pathol* 2002; 196(1): 8-16.

38. **Gsur A**, Zidek T, Schnattinger K et al: Association of microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk: a quantitative review. *Biomarkers* 2002; 7(3): 230-41.
39. **Givelber RJ**, Couropmitree NN, Gottlieb DJ et al.: Segregation analysis of pulmonary function among families in the Framingham Study. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(5 Pt 1):1445-51.
40. **Helling RB**, Goodman HM, Boyer HW: Analysis of R.EcoRI fragments of DNA from lamdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol* 1974; 14: 1235-1244.
41. **Higgins M** und Keller J: Familial occurrence of chronic respiratory disease and familial resemblance in ventilatory capacity. *J Chron Dis* 1975; 28(4):239-51.
42. **Hubert HB**, Fabsitz RR, Feinleib M und Gwinn C: Genetic and environmental influences on pulmonary function in adult twins. *Am Rev Respir Dis* 1982; 125(4): 409-15.
43. **Hajeer AH**, Lazarus M, Turner D et al.: IL-10 gene promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1998; 352(9122):142-5.
44. **Harrison DJ**, Cantlay AM, Rae F, Lamb D, Smith CA: Frequency of glutathione S transferase M1 deletion in smokers with emphysema and lung cancer. *Hum Exp Toxicol* 1997; 16(7): 356-60.
45. **Hatanaka H**, Abe Y, Kamija T et al.: Clinical implications of interleukin (IL)-10 induced by non-small cell lung cancer. *Ann Oncol* 2000; 11(7): 815-9.

46. **Hatanaka H**, Abe Y, Naruke M et al.: Significant correlation between interleukin 10 expression and vascularisation through angiopoietin/TIE2 networks in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2001; 7(5): 1287-92.

47. **Hegab AE**, Sakamoto A, Saitho W et al.: Polymorphisms of TNFalpha, IL1beta, and IL1RN genes in chronic obstructive pulmonary disease. Biochem Biophys Res Commun 2005; 329(4):1246-52.

48. **Hegab AE**, Sakamoto T, Uchida Y et al.: CLCA1 gene polymorphism in chronic obstructive pulmonary disease. J Med Genet 2004; 41(3): e27.

49. **Higgins MW**, Thom T. Incidence, prevalence and mortality: intra- and intercountry differences. In: Hensley MJ, Saunders NA, eds. Clinical Epidemiology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. New York, Mercel Dekker Inc., 1989; pp. 23-42.

50. **Higham MA**, Pride NB, Alikhan A und Morrell NW: Tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism in chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J 2000; 15(2): 281-4.

51. **Howard M**, O`Garra a, Ishida H, de Waal, Malefyt R, de Vries J: Biological properties of interleukin-10. J Clin Immunol 1992; 12:239-47.

52. **Huang S-J**, Su CH und Chang SC: Tumor necrosis factor alpha gene polymorphism in chronic bronchitis. Am J Respir Crit Care Med (AJRCCM) 1997; 156(5): 1436-9.

53. **Ishii T**, Matsuse T, Teramoto S, et al. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999;54(8):693-6.
54. **Ishii T**, Matsutse T, Teramoto S et al.: Neither IL-1 beta, IL-1 receptor antagonist haplotypes, nor TNF-alpha polymorphisms are associated with susceptibility to COPD. *Respir Med* 2000; 49(9): 847-51.
55. **Islam SS**, Schottenfeld D: Declining FEV1 and chronic productive cough in cigarette smokers: a 25-year prospective study of lung cancer incidence in Tecumseh, Michigan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3(4):289-98.
56. **Jäättelä M**: Biology of disease: Biologic activities and mechanisms of action of Tumor Necrosis Factor- α / Cachectin. *Lab Invest* 1991; 64(6):724-42.
57. **Janus ED**, Phillips NT und Carrell RW: Smoking, lung function an alpha-1-antitrypsin deficiency. *Lancet* 1985;1(8421):152-4.
58. **Jeffrey PK**: Structural and inflammatory changes in COPD: A comparison with asthma. *Thorax* 1998; 53:129-36.
59. **Jemal A**, Murray T, Ward E et al.: Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:10-30.
60. **Jemal A**, Tiwar RC, Murray T et al.: Cancer statistics, 2004. *CA. Cancer J Clin* 2004; 54:8-29.
61. **Jiang L**, He B, Zhao MW, Ning LD, Li XY und Yao WZ: Association of gene polymorphism of tumor necrosis factor-alpha

- and interleukin-13 with chronic obstructive pulmonary disease in Han nationality in Beijing. Chin Med J 2005; 118(7):541-7.
62. **Joos L**, He JQ, et al: The role of matrix metalloproteinase polymorphism in the rate of decline in lung function. Hum Mol Genet 2002; 11(5):569-76.
63. **Joost O**, Wilk JB, Cupples LA et al.: Genetic loci influencing lung function: a genome-wide scan in the Framingham Study. Am J Respir Crit Care Med 2002; 165(6): 795-9.
64. **Kauffmann F**, Tager IB, Munoz A, Speizer FE: Familial factors related to lung function in children aged 6-10 years. Results from the PAARC epidemiologic study. Am J Epidemiol 1989; 129(6): 1289-99.
65. **Keatings VM**, Cave SJ, Henry MJ et al.: A polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region may predispose to a poor prognosis in COPD. Chest 2000; 118(4):971-5.
66. **Keatings VM**, Barnes PJ: Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma and normal subjects. Am J Respir Crit Care Med 1997, 155:449-53.
67. **Keatings VM**, Collins PD, Scott DM und Barnes PJ: Differences in Interleukin-8 and Tumor Necrosis Factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. Am J Respir Crit Care Med 1996; 153:530-34.

68. **Kube D**, Platzer C, von Knethen A, Straub H, Bohlen Hafner M, Tesch H: Isolation of the human interleukin 10 promoter. Characterization of the promoter activity in burkitt's lymphoma cell lines. *Cytokine* 1996; 7:1-7.
69. **Kueppers F**, Miller RD, Gordon H, Hepper NG und Offord K: Familial prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in a matched pair study. *Am J Med* 1977;63(3):336-42.
70. **Kurzius-Spencer M**, Holberg CJ, Martinez FD und Sherrill DL: Familial correlation and segregation analysis of forced expiratory volume in one second (FEV1), with and without smoking adjustments, in a Tuscon population. *Ann Hum Biol* 2001; 28(2):222-34.
71. **Larson RK**, Barman ML, Kueppers F und Fudenberg HH: Genetic and environmental determinants of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med* 1970; 72(5):627-32.
72. **Lazarus M**, Hajeer AH, Turner D et al.: Genetic variation in the interleukin gene promoter and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1997; 24(12):2314-7.
73. **Lebowitz MD**, Knudson RJ und Burrows B: Family aggregation of pulmonary function measurements. *Am Rev Respir Dis* 1984; 129(1):8-11.
74. **Levy Y**, Brouet JC: Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *JCI* 1994; 9:424.

75. **Lim S**, Crawley E, Woo P und Barnes PJ: Haplotype associated with low interleukin-10 production in patients with severe asthma. *Lancet* 1998; 352(9122):113.
76. **Lim S**, Roche N, Oliver BG, Mattos W, Barnes PJ Fan Chung K: Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor metalloprotease from alveolar macrophages in cigarette smokers. *AJRCCM* 2000; 162:1355-60.
77. **Little J** und Khoury MJ: Mendelian randomization: a new spin or a real progress? *Lancet* 2003; 362(9388):930-1.
78. **Lokke A**, Scharling H, Vestbo J, Lange P. Developing COPD: a 25 year follow-up study of the general population (abstract). *Eur Respir J* 2005; 26:434s.
79. **Luk C**, Tsao MS, Bayani J, Shepherd F und Squire JA: Molecular cytogenetic analysis of non small cell lung carcinoma by spectral karyotyping and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 125(2):87-99.
80. **Madison R**, Zelman R und Mittman C: Inherited risk factors for chronic lung disease. *Chest* 1980; 77(2 Suppl): 255-7.
81. **Malkinson A**, Bauer A, Meyer A, Dwyer-Nield L, Koski K, Keith R, Geraci M, Miller Y: Experimental evidence from an animal model of adenocarcinoma that chronic inflammation enhances lung cancer risk. *Chest* 2000; 117(5 Suppl 1):228S.
82. **Mannino DM**: COPD: Epidemiology, prevalence, morbidity and mortality and disease heterogeneity. *Chest* 2002; 121(5Suppl):121S-126S.

83. **Mannino DM**, Buist AS, Petty TL, Enright PL, Redd SC: Lung function and mortality in the United States: data from the First National Health and Nutrition Examination Survey following up study. *Thorax* 2003; 58(5):388-93.
84. **Mannino DM**: Chronic obstructive pulmonary disease: definition and epidemiology. *Respir Care* 2003; 48(12): 1185-91.
85. **Mukhopadhyay S**, Hoidal JR und Mukherjee TK: Role of TNF a in pulmonary pathophysiology. *Respir Res* 2006; 7:125. Review
86. **Mayne ST**, Buenconsejo J, Janerich DT: Familial cancer history and lung cancer risk in United States non-smoking men and women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8:1065-9.
87. **Messer G**, Spengler U, Jung MC et al.: Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *J Exp Med* 1991; 173(1): 209-19.
88. **DeMeo DL**, Celedon JC, Lange C et al.: Genome-wide linkage of forced mid-expiratory flow in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170(12):1294-301. Review.
89. **Needham M** and Stockley RA: Alpha-1 antitrypsin deficiency. 3: Clinical manifestations and natural history. 2004 (Rev.)
90. **Newton CG** and Graham A: PCR. Spektrum Verlag 1994.

91. **Park JY**, Chen L, Wadhwa N und Tockman MS: Polymorphisms for microsomal epoxid hydrolase and genetic susceptibility to COPD. *Int J Mol Med* 2005; 15(3): 443-8.
92. **Papi A**, Casoni G, Caramori G et al.: COPD increases the risk of squamous histological subtype in smokers who develop non-small lung carcinoma. *Thorax* 2004; 59:679-81.
93. **Pauwels RA**, Buist AS, Calverley PMA et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1256-1276.
94. **Petersen I**, Bujard M, Petersen S et al.: Patterns of chromosomal imbalances in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Res* 1997; 57(12): 2331-5.
95. **Peto R**, Chen Z-M, Boreham J: Tobacco: the growing epidemic. *Nature Med* 1999, 5:15-7.
96. **Petty TL**: Lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease *Hematol Oncol Clin North Am* 1997;11(3):531-41.
97. **Pritchard JK** und Rosenberg NA: Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *Am J Hum Genet* 1999 65(1):220-8.
98. **Pober JS**, Gimbrone MA, Lapierre LA, Mendrick DL, Fiers W, Rothlein R et al.: Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by IL-1, TNF and immune interferon. *J Immunol* 1986; 137:1893-6.

99. **Redline S**, Tishler PV, Lewitter FI, Tager IB, Munoz A und Speizer FE: Assessment of genetic and nongenetic influences on pulmonary function. A twin study. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135(1):217-22.

100. **Redline S**, Tishler PV, Rosner B et al.: Genotypic and phenotypic similarities in pulmonary function among family members of adult monozygotic and dizygotic twins. *Am J Epidemiol* 1989; 129(4):827-36.

101. **Reuss E**, Fimmers R, Kruger A, Becker C, Rittner C, Hohler T: Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors – a twin study. *Genes Immun* 2002; 3:407-13.

102. **Rybicki BA**, Beaty TH und Cohen BH: Major genetic mechanisms in pulmonary function. *J Clin Epidemiol* 1990; 43(7): 667-75.

103. **Sakao S**, Tatsumi K, Igari H, Shino Y, Shirasawa H, Kuriyama T: Association of tumor necrosis factor alpha gene promoter polymorphism with the presence of chronic obstructive pulmonary disease. *AJRCCM* 2001; 163:420-2.

104. **Sandford AJ**, Changani T, Weir TD, Connett JE, Anthonisen NR, Pare PD: Susceptibility genes for rapid decline of lung function in the lung healthy study. *AJRCCM* 2001a; 163:1-22.

105. **Sandford AJ**, Chagani T, Weir TD, Connett JE, Anthonisen NR und Pare PD: Susceptibility genes for rapid decline of lung function in the lung health study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001b; 163(2):469-73.

106. **Schabath MB**, Delclos GL, Martynowicz MM, et al.: Opposing effects of emphysema, hay fever, and select genetic variants on lung cancer risk. *Am J Epidemiol* 2005; 161:412-22.
107. **Schabath MB**, Spitz MR, Zhang X, Delclos GL und Wu X: Genetic variants of myeloperoxidase and lung cancer risk. *Carcinogenesis* 2000; 21(&): 1163-6.
108. **Seersholm N**: PiMZ and COPD: will we ever know? *Thorax* 2004; 59(10):823-5.
109. **Sherrill DL**, Lebowitz MD, Burrows B. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med* 1990; 11(3):375–387.
110. **Shigeoka JW**, Hall WJ, Hyde RW et al.: The prevalence of alpha-antitrypsin heterozygotes (PiMZ) in patients with obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1976;114(6):1077-84.
111. **Shimura T**: The study of TNF beta gene polymorphism in lung cancer patients, *Cancer* 1994; 73(4):1184-8.
112. **Silva GE**, Sherrill DL, Guerra Sund Barbee RA: A longitudinal study of alpha-1antitrypsin phenotypes and decline in FeV1 in a common population. *Chest* 2003;123(5):1435-40.
113. **Silverman EK**, Palmer JD, Mosley JD et al.: Genomewide linkage analysis of quantitative spirometric phenotypes in severe early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Hum Genet* 2002a; 70(5): 1229-39.

114. **Silverman EK**, Mosley JD, Palmer LJ et al.: Genome -wide linkage analysis of severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease: airflow obstruction and chronic bronchitis phenotypes. *Hum Mol Genet* 2002b; 11(6): 623-32.
115. **Skillrud DM**, Offord KP, Miller RD: Higher risk of lung cancer in chronic obstructive pulmonary disease. A prospective, matched, controlled study. *Ann Intern Med* 1986; 105:503-7.
116. **Smith GD** und Ebrahim S: ‚Mendelian randomisation‘ can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? *Int J Epidemiol* 2003; 32:1-22.
117. **Soler N**, Ewig S, Torres A, Filella X, Gonzales J, Zaubet A: Airway inflammation and bronchiol microbial patterns in patients with stable chronic pulmonary disease. *ERJ* 1999; 14:1015-22.
118. **Suarez A**, Castro P, Alonso R, Mozo LC, Gutierrez C: Interindividual variations in constitutive interleukine-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphism. *Transplantation* 2003; 15:711-7.
119. **Tager I**, Tishler PV, Rosner B, Speizer FE und Litt M: Studies of the family aggregation of chronic bronchitis and obstructive airway disease. *Int J Epidemiol* 1978; 7(1):55-62.
120. **Tager IB**, Rosner B, Tishler PV, Speizer FE und Kass EH: Household aggregation of pulmonary function and chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1976; 114(3):485-92.
121. **Tager IB**, Segal MR, Speizer FE, Weiss ST. The natural history of forced expiratory volumes: effect of cigarette smoking and respiratory symptoms. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138:837–849.

122. **Takanashi S**, Hasegawa Y, Kauhira Y, Yamamoto K, Fujimoto K, Satok K, Okamura K: Interleukin-10 levels in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers. *Eur Respir J* 1999; 14:309-314.
123. **Thompson PB**, Daughton D, Robbins GA et al.: Intramural airway inflammation in chronic bronchitis. Characterization and correlation with clinical parameters. *Am Rev Respir Dis* 1989, 140:1527-37.
124. **Tobin MJ**, Cook PJ und Hutchinson DC: Alpha 1 antitrypsin deficiency: the clinical and physiological features of pulmonary emphysema in subjects homozygous for Pt type Z. A survey by the British Thoracic Association. *Br J Dis Chest* 1983;77(1):14-27.
125. **Turato G**, DiStefano A, Maestrelli P et al.: Effect of smoking cessation on airway inflammation in chronic bronchitis. *JRCCM* 1995; 152:1666-72.
126. **Turner DM**, Williams DM, Sanakaran D, Lazarus M, Sinnott PJ und Hutchinson IV: An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997; 24(1): 1-8.
127. **De Vita F**, Orditura M, Galizia G, Romano C, Roscigno A, Lieto E, Catalano G: Serum interleukin-10 levels as a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer patients. *Chest* 2000; 117:365-373.
128. **Wang P**, Wu P, Siegel MI, Egan RW und Billah MM: IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 1994; 153(2): 811-6.

129. **Warzocha K**, Ribeiro P, Bienvenu J, Roy P, Charlot C, Rigal D, Coiffier B und Salles G: Genetic Polymorphisms in the Tumor Necrosis Factor Locus Influence Non-Hodgkin's Lymphoma Outcome. *Blood* 1998; 91(10):3574-3581.
130. **de Waal**, Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries J: Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 174:1209-20.
131. **Wilk JB**, DeStefano AL, Arnett DK et al.: A genome-wide scan of pulmonary function measures in the National Heart, Lung and Blood Institute Family Heart Study. *AM J Respir Crit Care Med* 2003; 167(11): 1528-33.
132. **Wilson AG**, Symons JA, McDowell TL, MCDevitt HO, Duff GW: Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(7): 3195-9.
133. **Yamada N**, Yamaya M, Okinaga S, et al. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet* 2000;66(1):187-95.
134. **Yoshikawa M**, Hiyama K, Ishioka S, Maeda H, Maeda A und Yamakido M: Microsomal epoxide hydrolase genotypes and chronic obstructive pulmonary disease in Japanese. *Int J Mol Med* 2000; 5(1): 49-53.
135. **Zheng T**, Zhu Z, Wang Z, Homer RJ, Ma B, Riese Jr. RJ, Chapman Jr HA, Shapiro SD, Elias JA: Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and

- cathepsin-dependent emphysema. J Clin Invest 2000, 106:1081-93.
136. **Zhou W**, Liu G, Miller DP et al.: Polymorphisms in the DANN repair genes XRCCI and ERCC2, smoking, and lung cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2003; 12(4): 359-65.
137. **Zhu Y**, Spitz MR, Lei L, Mills GB und Wu X: A single nucleotide polymorphism in the matrix metallo proteinase-1 promoter enhances lung cancer susceptibility. Cancer Res 2001; 61(1): 1-14.

ANHANG

MATERIALIEN

Geräte

- Vortex Maschine: REAX 2000 (Heidolph, München, D)
- Zentrifuge: Biofuge fresco (Heraeus Instruments, Osterode, D)
- PCR-Maschine: Gene Amp System 9600 (Perkin Elmer, Weiterstadt, D); RoboCycler® Gradient 40 (Stratagene, Amsterdam, NL)
- Gelelektrophoresekammern:
- PA-Gele: Model SE 250-10A-.75 (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco USA)
- Agarose-Gele: Easy Cast Electrophoresis System B2 (Owl Scientific, Woburn, USA)
- Rüttler: Promax 1020 (Heidolph, München, D)
- Brutschrank: Modell 100-800 (Mettler, Schwabach, D)
- Heizblock: ERICOMP Twin Block™, Rotilab-Block-Heater H250 (Roth, Karlsruhe)
- Photometer: Gene Quant II; RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech, Cambridge, GB)

Labormaterialien:

- Blutentnahmekanülen
- Eppendorf Cups 2,0; 1,5 ml und 0,5 ml
- 5 ml EDTA-Monovetten
- Pipetten

Chemikalien, Reagenzien, Kits

- Ammoniumpersulfat (Sigma, St.Louis, USA)
- Acrylamid 40% (Sigma, St.Louis, USA)
- Agarose Ultrapure (Gibco BRL, Eggenstein, D)
- Aqua ad injectabilia (Braun, Melsungen, D)
- 5x TBE 5x Puffer (Tris-Borate-EDTA-Puffer) (Sigma, St.Louis, USA)
- 10x TAE Puffer (0.4M Tris, Essigsäure, 0.1M EDTA) (BioWhittaker, CAMBREX, Maryland, USA)
- TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin) 99% (Sigma, St.Louis, USA)
- dNTP 2'-Deoxynucleoside-5'-Triphosphate (Gibco BRL, Eggenstein, D)
- Ethanol absolut (Apotheke Universitätskliniken Marburg)
- Ethidiumbromid 1% (Roth, Karlsruhe, D)
- Gel Loading Solution TypeI 6x Concentr. (Sigma, St.Louis, USA)
- Taq Polymerase (Boehringer, Mannheim, D)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, D)

Enzyme und Längenstandards

- Molecular weight Marker VIII (GIBCO BRL, Eggenstein, D)
- dNTP Set, Taq DNA Polymerase, Nco I (Boehringer, Mannheim, D)
- Nla III, BseRI, Ase I (New England Biolabs, New England, USA)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A, C, G, T	DNA Mononukleotide: Adenin, Guanin (Purinbasen); Cytosin, Thymin (Pyrimidinbasen)
AAT	Alpha-1 Antitrypsin
AC	Adenokarzinom
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BC	Bronchialkarzinom
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	3'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylen-Diaminessigsäure
FeV ₁	forciertes expiratorisches Einsekundenvolumen
FVC	forcierte Vitalkapazität
GST	Glutathion-S Transferase
HWE/HWG	Hardy-Weinberg Equilibrium/ -Gleichgewicht
IL	Interleukin
KHK	koronare Herzerkrankung
KI	Konfidenzintervall
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NSCLC	Non Small Cell Lung Carcinoma
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Plattenepithelkarzinom
PEF	Peak Expiratory Flow
py	pack year (Anzahl gerauchter Päckchen Zigaretten/Tag/Jahr)
RFLP	Restriktionsfragment Längenpolymorphismus
rpm	Umdrehungen/Minute
SNP	Single Nucleotide Polymorphism, Einzelbasenaustausch
SCLC	Small Cell Lung Carcinoma
Taq	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Nekrose Faktor

Meine akademischen Lehrer an der Universität Marburg waren die
Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Arnold, Aumüller, Bals, Basler, Baum, Barth; Beato; Bertalanffy, Bien,
Cetin; Christiansen; Czubayko, Daut, Fuhrmann, Feuser; Fruhstorfer;
Gemsa; Gröne; Grzeschnik, Geks, Geus, Gotzen, Gress, Gressner,
Griss, Habermehl; Hasilik; Hellinger; Hesse; Hofmann, Hofbauer,
Happle, Hielscher, Hoyer, Joseph, Kälble, Kann, Kern, Klenk, Klose,
Kleine; Köhler, Kretschmer; Krieg; Kroll; Kuhn; Kuhlmann, Koolmann,
Kroll, Krieg, Kuni, Lang, Lange, Lennartz, Maisch, Mennel, Moll,
Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Örtel, Pfab, Remschmidt, Richter,
Ritter, Röhm, Rothmund, Rehder; Schachtschabel; Schäfer; Schulze;
Scharz; Schneider, Seifart; Sturm Schäfer, Schmidt, Schüffel, Schulz,
Seitz, Seyberth, Slenczka, Steiniger, Tebbe, Thomas, Vogelmeier, Voigt,
Vohland; Westermann, von Wichert, Weihe, Werner.



Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. em. Dr. P. von Wichert und Herrn Prof. Dr. C. Vogelmeier für das Überlassen des Themas und Frau Priv.-Doz. Dr. C. Seifart für die intensive Betreuung und die freundliche und fortwährende Unterstützung, die für die erfolgreiche Durchführung dieser Arbeit notwendig waren.

Ich möchte mich auch herzlich bei Frau Dr. D. Brödje, Frau U. Clostermann und Frau E. Beato für die hervorragende praktische Anleitung und Einarbeitung in die vermeintlichen Geheimnisse experimenteller Methoden, die Beantwortung zahlloser Fragen und das Aushalten des Tumultes im Labor bedanken.

Ein herzlicher Dank auch an alle beteiligten Patienten und Probanden, die diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Meiner Mutter danke ich für die nicht immer einfache, aber letztendlich geduldige Distanz beim Werden und auch beim Werden dieser Arbeit.

Last but not least, dem großen Klugen: „Mein lieber Elefant, Du weißt, dass ich diese Zeilen schreibe, um über das Wichtigste nichts zu sagen und Du weißt, was es ist.“ Dem Beifahrer par excellence: Danke Roger.